

**Entwicklung und Anwendung von Methoden zur
Untersuchung der *in vivo*-Alkylierung in Abhängigkeit
von der Tabakrauchexposition mit Hilfe
unterschiedlicher Biomarker**

Michael Urban

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Entwicklung und Anwendung von Methoden zur
Untersuchung der *in vivo*-Alkylierung in Abhängigkeit
von der Tabakrauchexposition mit Hilfe
unterschiedlicher Biomarker

Von

Michael Urban

aus

Augsburg

2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von PD Dr. G. Scherer und Prof. Dr. F. Bracher betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 20.12.2001

Michael Urban

Dissertation eingereicht am:	20.12.2001
1. Gutachter:	PD Dr. G. Scherer
2. Gutachter:	Prof. Dr. F. Bracher
Tag der mündlichen Prüfung:	07.02.2002

Meinen Eltern

Boden können wir zurückgewinnen,

Zeit niemals.

Napoleon Bonaparte

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Franz Bracher für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät und die Begutachtung, die stets freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Möglichkeit zur Teilnahme am Arbeitskreisseminar.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Gerhard Scherer möchte ich für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine engagierte Betreuung und jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft sowie die Freiheit bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Dr. Michael Meger, der mir eine fundierte Einarbeitung in die Spurenanalytik zuteil werden ließ und somit den Grundstein zu dieser Arbeit gelegt hat. Die freundschaftliche Zusammenarbeit und Betreuung bei der Durchführung der Arbeit waren von unschätzbarem Wert.

Frau Irmtrud Meger-Kossien danke ich für die Bestimmung von Cotinin, die jederzeit gute Zusammenarbeit und ihre große Hilfsbereitschaft während der Anfertigung meiner Arbeit.

Frau Michaela Baer-Koetzle möchte ich für die Bestimmung des Kreatinins danken, und ihre allzeit gute Laune und die vielen ungenannten Kleinigkeiten erwähnen, die den Arbeitsalltag angenehmer machten.

Allen Mitarbeitern des ABF danke ich für ihre freundliche Unterstützung und die nette kollegiale Atmosphäre.

Besonderer Dank gilt meiner Familie für die viele Geduld und die großzügige Unterstützung, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz spezieller Dank gilt Frau Ilonka Mehling, die mir mit großem Einsatz und liebevoller Freundschaft half und immer da war, wenn ich sie brauchte.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Geschichtlicher Hintergrund	1
1.2	Entstehung und Vorkommen alkylierender Substanzen.....	3
1.2.1	Vorläufer im Tabakrauch	3
1.1.2	Weitere Quellen alkylierender Verbindungen.....	8
1.2	Metabolismus der Alkylanzien-Vorläufer	12
1.3	Metabolischer Polymorphismus und Suszeptibilität	20
1.4	Auswirkungen der Alkylierung.....	22
1.4.1	N-Nitrosamine	24
1.4.2	Acrylnitril	25
1.4.3	Ethylenoxid	26
1.4.4	Acrolein.....	26
1.4.5	Ethylcarbamat.....	26
1.5	Möglichkeiten des Biomonitorings für alkylierende Substanzen	27
2	ZIELSETZUNG	32
3	MATERIALIEN UND EXPERIMENTELLE METHODEN.....	33
3.1	Probandenstudie.....	33
3.1.1	Probanden.....	33
3.1.2	Studiendesign	33
3.1.3	Protokoll- und Fragebögen.....	34
3.2	Laborgeräte und Chemikalien	34
3.2.1	Laborgeräte (alphabetisch).....	34
3.2.2	Chemikalien und Gase (alphabetisch).....	38
3.3	Arbeitslösungen	40
3.4	Analytik der Hämoglobinaddukte	44
3.4.1	Prinzip der Methode	44

3.4.2	Synthese von Standardverbindungen	45
3.4.3	Kalibratoren.....	47
3.4.4	Messgeräte und chromatographische Bedingungen	48
3.4.4.1	GC-MS/EI	48
3.4.4.2	GC-MS/NICI (EC)	49
3.4.5	Bestimmung der Hämoglobinaddukte.....	50
3.4.5.1	Probenlagerung.....	50
3.4.5.2	Gewinnung des Erythrozytenhämolysats	50
3.4.5.3	Isolierung des Globins.....	51
3.4.5.4	Derivatisierung und Aufarbeitung des Globins.....	51
3.4.5.4.1	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Addukte mittels Festphasenextraktion	51
3.4.5.4.2	Etablierung einer Methode zur Bestimmung der Addukte ohne Festphasenextraktion	53
3.4.6	Identifizierung der Analyten	54
3.4.7	Kalibrierung	54
3.4.8	Berechnung der Ergebnisse	55
3.4.9	Validierung der Methoden	56
3.4.9.1	Methode mit Festphasenextraktion	56
3.4.9.2	Methode ohne Festphasenextraktion	57
3.5	Analytik der Mercaptursäuren	57
3.5.1	Prinzip der Methode	57
3.5.2	Standardlösungen	58
3.5.3	Kalibratoren.....	59
3.5.4	Messgeräte und chromatographische Bedingungen	60
3.5.5	Probenaufarbeitung und Probenlagerung	62
3.5.5.1	Probenlagerung.....	62
3.5.5.2	Probenaufarbeitung durch Festphasenextraktion	62
3.5.6	Identifizierung der Analyten	63
3.5.7	Kalibrierung	64
3.5.8	Berechnung der Ergebnisse	65
3.5.9	Validierung der Methode	65
3.6	Analytik der Thioether	66

3.6.1	Prinzip der Methode	66
3.6.2	Kalibratoren.....	67
3.6.3	Messgerät und -bedingungen	67
3.6.4	Entwicklung einer Mikromethode zur Bestimmung der Thioether	68
3.6.4.1	Probenlagerung.....	68
3.6.4.2	Probenaufarbeitung	68
3.6.4.3	Extraktion	69
3.6.4.4	Alkalische Hydrolyse	69
3.6.4.5	Pipettierschema des Mikroansatzes.....	70
3.6.5	Kalibrierung	71
3.6.6	Berechnung der Ergebnisse	72
3.6.7	Validierung der Methode	73
3.7	Bestimmung der 3-Alkyl-Adenin-Addukte.....	73
3.7.1	Prinzip der Methode	73
3.7.2	Standardlösungen	74
3.7.3	Kalibratoren.....	75
3.7.4	Messgerät und chromatographische Bedingungen.....	75
3.7.5	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von 3-Alkyladeninen.....	77
3.7.5.1	Lagerung der Proben	77
3.7.5.2	Probenvorbereitung	77
3.7.5.3	Fixierung und Reinigung.....	78
3.7.5.4	Elution, Aufnahme und Lagerung.....	78
3.7.6	Identifizierung der Analyten	79
3.7.7	Kalibrierung	79
3.7.8	Berechnung der Ergebnisse	80
3.7.9	Validierung der Methode	80
3.8	Messung weiterer Biomarker.....	81
3.8.1	Bestimmung von Cotinin im Plasma und Urin	81
3.8.2	Bestimmung von Nikotin aus der Luft auf Personalsamplern	82
3.8.3	Thiocyanat in Plasma	82
3.8.4	Bestimmung von Kreatinin	82
3.8.5	Genotypisierung	83

4.	ERGEBNISSE	84
4.1	Hämoglobinaddukte.....	84
4.1.1	Globinisolierung und Synthese deuterierter Standards	84
4.1.2	Validierung der Methoden	85
4.1.2.1	Präzision	85
4.1.2.1.1	Präzision der Methode mit SPE (Methode 3.4.5.4.1).....	85
4.1.2.1.2	Präzision der Methode ohne SPE (Methode 3.4.5.4.2)	85
4.1.2.2	Wiederfindungsrate	86
4.1.2.2.1	Absolute Wiederfindungsrate.....	86
4.1.2.2.2	Relative Wiederfindungsrate.....	86
4.1.2.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	88
4.1.2.4	Linearität	89
4.1.2.5	Selektivität.....	89
4.1.2.5.1	Charakterisierung der Analyten und internen Standards durch Massenspektrometrie.....	89
4.1.2.5.2	Peakweite und Retentionszeit.....	97
4.1.2.6	Robustheit.....	97
4.1.3	Anwendung der Methoden auf die Studie.....	98
4.2	Mercaptursäuren.....	107
4.2.1	Validierung der Methode	107
4.2.1.1	Präzision	107
4.2.1.2	Wiederfindungsrate	109
4.2.1.2.1	Absolute Wiederfindungsrate.....	109
4.2.1.2.2	Relative Wiederfindungsrate.....	109
4.2.1.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	110
4.2.1.4	Linearität	111
4.2.1.5	Selektivität.....	112
4.2.1.5.1	Charakterisierung der Analyten und des internen Standards durch Fullscan-Massenspektren	112
4.2.1.5.2	Peakweite und Retentionszeit.....	118
4.2.2	Anwendung der Methode auf die Studie.....	118
4.3	Thioetheranalytik	122
4.3.1	Validierung der Methode	122

4.3.1.1	Präzision	122
4.3.1.2	Wiederfindung	122
4.3.1.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	122
4.3.1.4	Linearität	122
4.3.1.5	Selektivität	123
4.3.1.6	Korrelation mit Photometermethode	123
4.3.2	Anwendung der Methode auf die Studie	124
4.4	3-Alkyladenin-Analytik	126
4.4.1	Validierung der Methode	126
4.4.1.1	Präzision	126
4.4.1.2	Wiederfindung	127
4.4.1.2.1	Absolute Wiederfindungsrate	127
4.4.1.2.2	Relative Wiederfindungsrate	127
4.4.1.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	128
4.4.1.4	Linearität	129
4.4.1.5	Selektivität	130
4.4.1.5.1	Charakterisierung der Analyten und des internen Standards durch Q1- Fullscan-Spektren	130
4.4.1.5.2	Peakweite und Retentionszeit	133
4.4.2	Anwendung der Methode auf die Studie	133
4.5	Auswertung der Studie	137
4.5.1	Zusammenhang mit Tabakrauchexposition	137
4.5.1.1	Rauchergruppe	137
4.5.1.2	Nichtrauchergruppe	145
4.5.2	Zusammenhang zur Ernährung	148
4.5.2.1	Rauchergruppe	148
4.5.2.2	Nichtrauchergruppe	149
4.5.3	Zusammenhang mit genetischen Polymorphismen	150
4.5.3.1	Rauchergruppe	150
4.5.3.2	Nichtrauchergruppe	151
4.5.4	Korrelationen der Biomarker untereinander	152
4.5.4.1	Rauchergruppe	152
4.5.4.2	Nichtrauchergruppe	158

5	DISKUSSION	161
5.1	Hämoglobinaddukte.....	161
5.1.1	Analytische Methoden.....	161
5.1.2	Vergleich mit Literaturdaten	171
5.2	Mercaptursäuren.....	174
5.2.1	Analytische Methode.....	174
5.2.2	Vergleich mit Literaturdaten	181
5.3	Thioether	183
5.3.1	Analytische Methode.....	183
5.3.2	Vergleich mit Literaturdaten	186
5.4	DNA-Addukte	187
5.4.1	Analytische Methode.....	187
5.4.2	Vergleich mit Literaturdaten	192
5.5	Genereller Zusammenhang der Biomarker.....	193
5.5.1	Einfluss des Rauchverhaltens.....	193
5.5.2	Einfluss der ETS-Exposition.....	196
5.5.3	Auswirkung der Ernährungsweise	199
5.5.4	Einfluss der genetischen Polymorphismen	200
5.5.5	Anwendbarkeit der Methoden.....	201
6	ZUSAMMENFASSUNG	203
7.	LITERATURVERZEICHNIS	206
8	ANHANG	231
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	231
8.2	Kontrollkarten.....	234
8.3	Tabellenanhang	236

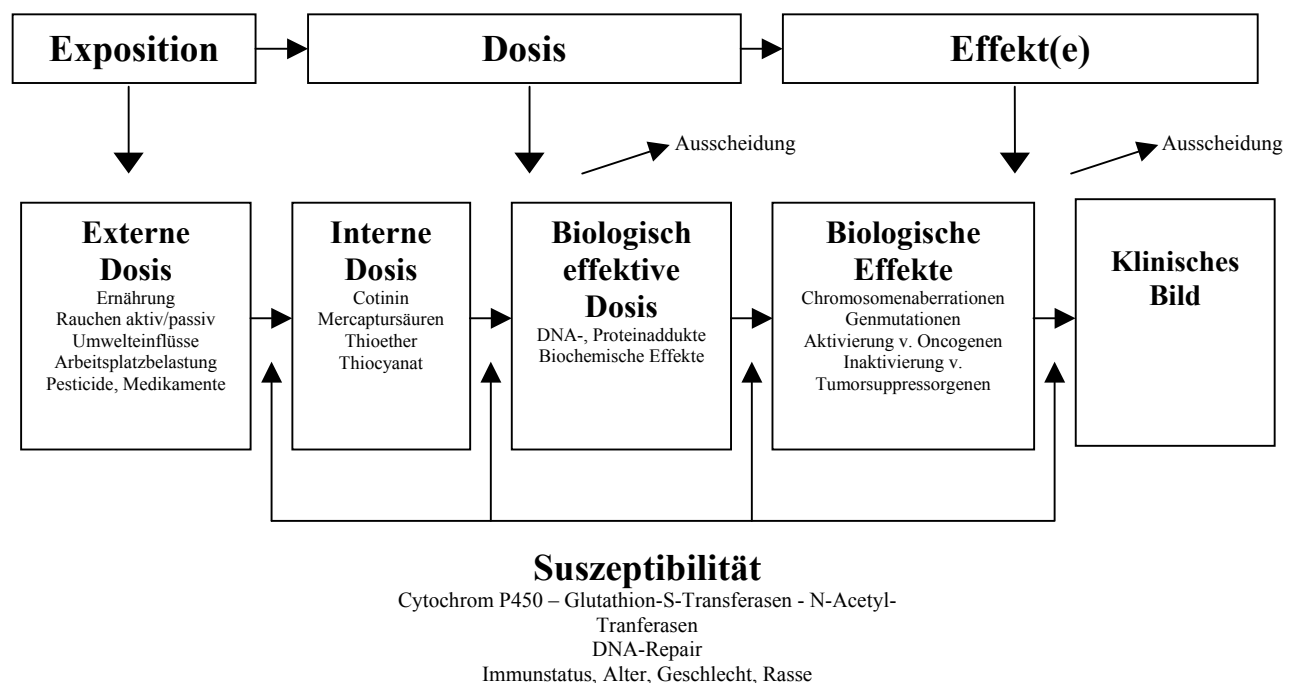
1 Einleitung

1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Die historischen Anfänge zum Verständnis der Kanzerogenese lassen sich in Europa bis in das 18. Jahrhundert zurückverfolgen. Sir Percival Pott [1] beobachtete 1775 das vermehrte Auftreten von Hodenkrebs bei Schornsteinfegern und führte es auf die Kontaktwirkung mit Ruß zurück. In den folgenden Jahren wurde diese Beobachtung durch erste epidemiologische Studien bestätigt, wonach bei Arbeitern in Paraffin-Raffinerien und Kohle verarbeitenden Betrieben verstärkt Tumoren auftraten [2]. 1895 publizierte der Mediziner Rehn seine Beobachtungen über das Auftreten von Blasentumoren bei Anilinarbeitern. Erste Laborexperimente gehen auf die Jahrhundertwende zurück. 1918 behandelten Yamagiwa und Ichikama Kaninchenohren mit Steinkohlenteer in Form eines Pinseltestes und beobachteten Veränderungen der Haut. Hieger und Cook machten dafür einzelne chemische Verbindungen verantwortlich und isolierten 1930 das erste, wie sich herausstellte, chemische Kanzerogen, 1,2,5,6-Dibenzanthracen aus Teer [3]. Dass einzelne Substanzen Tumore ausbilden können, bewiesen Sasaki und Yoshida schon 1935 durch Fütterungsversuche mit o-Aminoazotoluol. Es wuchs die Erkenntnis, dass die beim Menschen bekannt gewordenen Krebserkrankungen auf in der Umwelt befindliche Chemikalien zurückzuführen seien. Ab den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden für die meisten industriell relevanten Chemikalien Langzeittierversuche durchgeführt, die zum Teil mehrere Jahre in Anspruch nahmen. So entdeckten 1956 Magee und Barnes beispielsweise die tumorigene Wirkung von Dimethylnitrosamin (NDMA) bei Ratten [4]. 1970 begann eine neue Ära in der experimentellen Krebsforschung. Da man von einer Korrelation zwischen Kanzerogenität und Mutagenität bei vielen Verbindungen wusste, wurden bakterielle Testsysteme eingeführt, die zunächst bekannte Kanzerogene auf Grund ihrer mutagenen Aktivität erkannten [5,6]. Zu diesem Zeitpunkt war es unmöglich geworden, sämtliche potentiell kanzerogenen Stoffe in aufwendigen Tierversuchen zu testen. Der Begriff der Mutation war 1928 von Bauer in die chemische Kanzerogenese eingeführt worden. Für ihn bestanden Tumorzellen aus mutierten gesunden Zellen. Dass für diese Mutationen tatsächlich chemische Verbindungen verantwortlich sind, wurde 20 Jahre später bewiesen, als Miller und Miller [7] zeigen konnten, dass Azofarbstoffe nach Fütterung an Leberzellen gebunden sind. Der überzeugendste Beweis für die Mutationstheorie Bauers wurde von Latarjet geführt. Mit Hilfe einer chemischen Verbindung gelang es ihm, Mutationen in Bakterienstämmen zu erzielen.

Der wesentliche Beitrag für die Entwicklung der Addukt- und Mutationsforschung war die Aufklärung der molekularen Struktur der Nukleinsäuren durch Watson und Crick im Jahre 1953.

Einen modernen Ansatz in der chemischen Kanzerogenese beim Menschen stellt die molekulare Epidemiologie dar. Ziel ist es, eine individuelle Risikoabschätzung nach Schadstoffexposition vornehmen zu können und gegebenenfalls u.a. auch chemopräventive Maßnahmen einleiten zu können. In der ersten Phase beschäftigte man sich mit der Bestimmung der Belastungssituation durch Untersuchung zugänglicher Indikatormedien. Aufnahmemenge und toxikologische Wirkung wurden anhand vorliegender experimenteller Daten aus Tierversuchen extrapoliert. Diese Schwäche wird zunehmend durch die Entwicklung spezifischer Biomarker ausgeräumt. Biomarker erlauben im Idealfall die Bestimmung der internen Dosis, es gibt jedoch darüber hinausgehende Einteilungen [8]. Biomarker der internen Dosis zeichnen sich durch hohe Präzision, Zuverlässigkeit und direkten Bezug zum möglichen individuellen Risiko aus. Eingebunden in epidemiologische Studien können sie Hinweise auf (zeitlich) später einsetzende Effekte geben. Die folgende Abbildung (Abb. 1.1) zeigt ein vereinfachtes Schema des Biomonitorings mit ausgewählten Beispielen für jeden Abschnitt.



Zunehmende Relevanz zur Gefährdung →

Abb. 1.1: Zusammenhang zwischen Exposition, Dosis, Effekten und Suszeptibilität (modifiziert nach [8,9])

Fremdstoffe, die vom Organismus aufgenommen werden, sollen möglichst rasch eliminiert werden. Die Geschwindigkeit der Elimination hängt vom Aufnahmeweg, der Absorption, der Verteilung und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanz ab. In mehreren Phasen werden die Stoffe in der Regel dahingehend metabolisiert, dass ihre Eliminationsgeschwindigkeit erhöht wird. Der Phase-I-Metabolismus wandelt apolare, lipophile Stoffe in polare Stoffe um und führt dabei funktionelle Gruppen ein oder setzt solche frei (demaskiert sie). Hierdurch wird es konjugierenden Enzymen des Phase-II-Metabolismus möglich, in der Regel große und sehr hydrophile endogene Moleküle mit dem so vor- oder umfunktionalisierten Fremdstoff zu konjugieren und in der Regel dadurch leicht ausscheidbar zu machen. Kanzerogene zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei der Verstoffwechslung zu hochreaktiven Spezies aktiviert werden, den ultimalen Kanzerogenen, die genotoxisch sind und mit Proteinen und DNA Addukte bilden können.

1.2 Entstehung und Vorkommen alkylierender Substanzen

1.2.1 Vorläufer im Tabakrauch

Beim Abrauchen von Tabak entsteht eine komplexe Mischung aus mehr als 4000 Verbrennungsprodukten [10]. Das Aerosol Tabakrauch wird durch ein komplexes Zusammenwirken von Destillations- und Sublimationsprozessen, von Pyrolyse-, Pyrosynthese- und Verbrennungsvorgängen gebildet. Entscheidend für seine qualitative und quantitative Zusammensetzung ist nicht allein das in der Zigarette befindliche Tabakmaterial und dessen Vorbehandlung sowie die Qualität des verwendeten Zigarettenpapiers und Art und Leistungsfähigkeit eines eventuell vorhandenen Filters [11-13], sondern vornehmlich die Temperatur, die im Glutkegel herrscht. Diese wird in der Literatur mit 700 – 900 °C angegeben [14], fällt jedoch in den Zugpausen um mehr als 300 °C auf unter 600 °C ab. Der Hauptstromrauch (HS) ist der Rauch, der die Zigarette, Pfeife oder Zigarre während der Züge am Mundende verlässt und vom Raucher unterschiedlich stark inhaliert wird [14]. Der HS enthält im Moment der Entstehung bis zu $1,3 \times 10^{10}$ heterogene runde und sphärische Partikel pro cm^3 mit einer Größe zwischen 0,2 und 0,4 μm [10]. Nebenstromrauch (NS) ist die Gesamtheit aller Rauchströme, die nicht Hauptstromrauch sind. Die Partikelgröße im Nebenstromrauch beträgt 0,1 – 0,2 μm . Praktisch entsteht NS fast ausschließlich am Glutkegel während der Zugpausen, wo er sich schnell mit Umgebungsluft mischt und

verdünnt wird. Der vom Nichtraucher eingeatmete Tabakrauch wird in der internationalen Literatur als Environmental Tobacco Smoke (ETS) bezeichnet und stellt ein dynamisches Gemisch dar, das aus 80 – 85 % Nebenstromrauch und 15 – 20 % exhaliertem (vom Raucher ausgeatmeten) HS besteht [15]. Bedeutsam ist die größere Hygroskopität und Koagulationsneigung von HS- im Vergleich zu NS- oder ETS-Partikeln. Das Mehrphasengemisch Tabakrauch kann experimentell in eine Gas- und Partikelphase [16,17] getrennt werden. Für dosimetrische Vergleiche zwischen Aktivrauchen und Passivrauchen sind Unterschiede in der Aufnahme und Elimination dieser Bestandteile zu berücksichtigen. So ist das Inhalationsmuster verschieden. Aktiv geraucht wird vorwiegend durch den Mund, während Passivrauch über die Nase aufgenommen wird, und es werden unterschiedliche Partikeldepositionsraten erzielt (Aktivrauchen 50 – 90 %, Passivrauchen 10 – 40 %) [18]. Auch der Depositionsort ist verschieden. Beim Rauchen werden die Partikel vorwiegend im Tracheobronchial-Bereich abgelagert (70 %), während beim Passivrauchen vorwiegend der Pulmonal-Bereich betroffen ist (90 %). Die Gasphase des HS besteht hauptsächlich aus Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid und Kohlenmonoxid, die zusammen ca. 85 % des Gesamtgewichtes des HS ausmachen [19,20]. Zu den tumorigenen Verbindungen in der Gasphase gehören unter anderem Benzol, aromatische Amine und flüchtige Nitrosamine. Die Partikelphase des HS enthält als Hauptkomponenten die *Nikotiana*-Alkaloide, wobei Nikotin die quantitativ wichtigste und pharmakologisch wirksamste Komponente ist. Das Tabakrauchkondensat enthält daneben auch Spuren von aromatischen Aminen, polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, Fettsäuren, Pflanzensteroiden und Polyphenolen [7]. Die Exposition mit ETS wird mit teilweise altersbedingter Ausbildung von Krankheiten des Atemtraktes [21] sowie der Entstehung von Lungenkrebs und anderen Krebsarten in Zusammenhang gebracht [22-25], obwohl eine genaue Zuordnung der Ursache dadurch erschwert wird, dass viele der im Tabakrauch enthaltenen Kanzerogene auch in der Umwelt vorkommen können [26]. Somit ist die Extrapolation des Risikos durch Aktivrauchen auf das durch Passivrauchen nicht ohne Einschränkungen möglich, da zwischen beiden Expositionsarten neben deutlichen quantitativen auch qualitative Unterschiede bestehen [27].

Die möglichen Vorläufer für eine Belastung mit alkylierenden Substanzen im Tabakrauch sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Zur Abschätzung der Dosis durch Rauchen und Passivrauchen, wird von folgenden Annahmen ausgegangen: Für Aktivraucher wird ein Durchschnittskonsum von 20 Zigaretten pro Tag angesetzt, für Nichtraucher eine tägliche Tabakrauchexposition von 3 Stunden [28]. Bei einer Depositionsrate für ETS-Partikel von 40

% ergibt sich eine Passivrauchdosis für Gasphasenkomponenten, die bei 1,1 – 3,8 % der Raucherndosis liegt, für partikelgebundene Komponenten eine solche von < 0,1 – 1,0 %.

Tab. 1.1: Verteilung alkylierender Verbindungen auf Haupt- und Nebenstromrauch von Zigaretten (pro Zigarette, mit und ohne Filter)

<i>Verbindung</i>	<i>HS</i>	<i>NS</i> (Konz. in ETS)	<i>Verhältnis</i> NS/HS	<i>Art d.</i> <i>Alkylierung</i>	<i>Referenz</i>
Acetaldehyd	0,5 – 1,2 mg	-	-	Hydroxy- ethylierung	[29]
	0,4 – 1,4 mg	-	-		[7]
	-	(170 – 630 µg/m ³)	-		
	0,2 – 1,3 mg	-	-		[30]
Acrylnitril	3,2 – 15 µg	-	-	Cyano- ethylierung	[7]
	10 µg				[30]
Aceton	100 – 250 µg	-	2 – 5		[29]
	100 – 650 µg	-	-		[7]
	78 – 560 µg	-	-		[30]
	153 – 935 µg	984 µg	ca. 4		[14]
Acrolein	60 – 100 µg	-	8 – 15	Hydroxy- propylierung	[29]
	60 – 140 µg	-	-		[7]
	-	(30 – 100 µg/m ³)	-		
	-	(0,2 – 27,2 µg/m ³)	-		[31]
	45 – 83 µg	-	-		[30]
	70 µg	925 µg	ca. 12		[14]
Ethylenoxid	0,02 µg	-	-	Hydroxy- ethylierung	[7]
Ethylen	150 – 250 µg	-	-	Ethylierung	[7]
	240 µg	-	-	Hydroxy- ethylierung	[30]
Amine					
Methylamin	4 – 10 µg	-	-	(Methylierung)	[7]
Ethylamin	0,96 – 25,5 µg	-	-	(Ethylierung)	[32]
Dimethylamin	1 – 10 µg	-	3,7 – 5,1	Methylierung	[32]
Diethylamin	0,1 µg	-	-	Ethylierung	[32]

Fortsetzung Tab. 1.1:

<i>Verbindung</i>	<i>HS</i>	<i>NS</i> (Konz. in ETS)	<i>Verhältnis</i> NS/HS	<i>Art d.</i> <i>Alkylierung</i>	<i>Referenz</i>
Andere flüchtige Amine	3 – 10 µg	-	-	Verschiedene reaktive Spezies	[7]
Tabakspezifische <i>N</i> -Nitrosamine (tobacco specific nitrosamines, TSNA)					
<i>N</i> -Nitrosornikotin (NNN)	0,2 – 3 µg	-	0,5 – 3	Pyridyloxobutyl-	[32]
	0,24 – 5,5 µg	0,15 – 16,6 µg	0,16 – 7,1	Addukte	[33]
	-	(< 0,1 – 6,0 ng/m ³)	-	weitere reaktive	[34]
	-	(8,3 ng/m ³)	-	Spezies	[34]
4-(Methylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1-butanon (NNK)	80 – 770 ng	-	1 – 4	Methylierung,	[32]
	0,11 – 4,2 µg	0,19 – 15,7 µg	0,19 – 8,26	Pyridyloxobutyl-	[33]
	-	(< 0,1 – 13,5 ng/m ³)	-	Addukte	[34]
	-	(9,3 ng/m ³)	-		[34]
<i>N</i> -Nitrosoanatabin (NAT)	0,33 – 4,6 µg	0 – 1,5 µg	0,31 – 0,95		[33]
<i>N</i> -Nitrosoanabasin (NAB)	0 – 150 ng	-	-		[32]
Flüchtige <i>N</i> -Nitrosamine (volatile nitrosamines, VNA)					
<i>N</i> -Nitrosodiethanol-amin	0 – 36 ng	-	-	Hydroxy- ethylierung	[32]
<i>N</i> -Nitrosopyrrolidin (NPYR)	0 – 110 ng	-	6 – 30	Verschiedene	[32]
	5,1 – 22 ng	204 – 387 ng	9,3 – 75,9	reaktive Spezies	[14]
	2,4 – 15 ng	7,2 – 150 ng	3,7 – 38,5		[35]
	-	(3,5 – 27,0 ng/m ³)	-		[34]
<i>N</i> -Nitrosodimethylamin (NDMA)	2 – 20 ng	-	20 – 100	Methylierung	[32]
	5,7 – 43 ng	680 – 1040 ng	19,1 – 160		[14]
	0 – 20 ng	155 – 401 ng	20 – 437		[35]
	0,1 – 180 ng	200 – 1040 ng	20 – 130		[7]
	-	(10 – 240 ng/m ³)	-		[7]
	-	(7,9 – 45,0 ng/m ³)	-		[34]
<i>N</i> -Nitrosomethylethyl- amin (NMEA)	0 – 2,7 ng	-	-	Methylierung,	[32]
	0 – 5,9 ng	9,4 – 30 ng	5,2 – 25	Ethylierung	[14]
	0 – 2,5 ng	3,1 – 24 ng	7,6		[35]
<i>N</i> -Nitrosodiethylamin (NDEA)	0 – 2,8 ng	-	-	Ethylierung	[32]
	0,8 – 3,8 ng	5,3 – 73 ng	2,2 – 78,8		[14]

Fortsetzung Tab. 1.1:

<i>Verbindung</i>	<i>HS</i>	<i>NS</i> (Konz. in ETS)	<i>Verhältnis</i> NS/HS	<i>Art d.</i> <i>Alkylierung</i>	<i>Referenz</i>
<i>N</i> -Nitrosopiperidin (NPIP)	0 – 9 ng	-	-	Verschiedene reaktive Spezies	[32]
<i>N</i> -Nitrosamino-säuren, Nicht-flüchtige <i>N</i> -Nitrosamine (non-volatile Nitrosamines, NVNA)					
3-(<i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -methylamino)-propionsäure	0,2 – 7,0 µg/g Tabak	-	-	Methylierung	[36]
4-(<i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -methylamino)-buttersäure	0,03 – 0,34 µg/g Tabak	-	-	Methylierung	[36]
<i>N</i> -Nitroso-DL-pipecolinsäure	0,04 – 0,34 µg/g Tabak	-	-		[36]
Sonstige					
Ethylcarbammat (Urethan)	20 – 38 ng	-	-	Ethylierung Hydroxy- ethylierung	[32]
Vinylchlorid	1,3 – 16 ng	-	-	u.a. Hydroxy- ethylierung	[32]
Methylchlorid	150 – 840 µg 1200 ppm	- -	- -	Methylierung	[37] [30]
Methylisocyanat	1,5 – 5 µg 0,55 µg	- -	- -		[32] [30]

Nimmt man eine 70 %-ige Retention der partikel-gebundenen TSNA in der Lunge an, ist ein Raucher (20 Zigaretten) 3,0 µg/Tag TSNA und ungefähr 0,4 µg/Tag VNA ausgesetzt [38]. Entsprechende Belastungen durch ETS in Räumen, in denen geraucht wird, reichen von 0,2 – 29,3 ng/m³ für NNK und 0,7 – 23 ng/m³ für NNN [31]. Real-life-Studien mit Erfassung der tatsächlichen Dosis durch Biomonitoring zeigen eine NNK-Exposition des Nichtrauchers von etwa 1 % der Dosis an, wie sie ein Raucher aufnimmt [39].

1.1.2 Weitere Quellen alkylrierender Verbindungen

Als weitere mögliche Quellen für alkylierende Verbindungen, die entweder direkt wirken oder metabolisch aktiviert werden müssen, sind neben Umwelteinflüssen, einer Belastung am Arbeitsplatz oder medikamentöser Aufnahme, vor allem aber Nahrungsmittel und eine mögliche endogene Bildung von Bedeutung.

Die Gesamtbelastung des Menschen mit *N*-Nitrosoverbindungen setzt sich aus einem exogenen und einem endogenen Anteil zusammen. Dabei versteht man unter exogener Belastung die Aufnahme vorgebildeter *N*-Nitrosamine. Zusätzlich nimmt der Mensch stickstoffhaltige Verbindungen auf, die mit nitrosierenden Agenzien - wie Nitrit oder Nitrat aus der Nahrung- endogen *N*-Nitrosamine bilden können [40].

Lebensmittel sind die Hauptquelle von *N*-Nitrosoverbindungen. Die Gesamtaufnahme durch die Nahrung wird auf 10 – 100 µg/Tag geschätzt [41-43]. Nitrit im Pökelsalz und verschiedene Stickoxide, die z.B. beim Räuchern gebildet werden, wirken als nitrosierende Agenzien, besonders auf sekundäre Amine. Zusätzlich werden *N*-Nitrosoverbindungen durch die Reaktion von im Rauch vorkommenden Aldehyden mit Aminosäuren wie Cystein gebildet [44]. Von geringer Bedeutung ist heute die Kontamination von Lebensmitteln mit *N*-Nitrosaminen aus Verpackungsmaterialien [41,45]. Die in Lebensmitteln vorkommenden *N*-Nitrosamine werden in zwei Gruppen eingeteilt: flüchtige *N*-Nitrosamine (volatile *N*-nitrosamines, VNA), meist niedermolekulare *N*-nitrosierte Dialkyl- oder cyclische Amine mit Siedepunkten < 100 °C, die aus den unterschiedlichsten Lebensmittel-Matrices in guten Ausbeuten (> 70 %) durch wässrige Destillation isoliert werden können und die zur gaschromatographischen Analyse nicht derivatisiert werden müssen. Die wichtigsten Vertreter dieser Substanzklasse sind *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA), *N*-Nitrosopyrrolidin (NPYR), *N*-Nitrosopiperidin (NPIP) und *N*-Nitroso-thiazolidin (NTHz) (Abb. 1.2) [46].

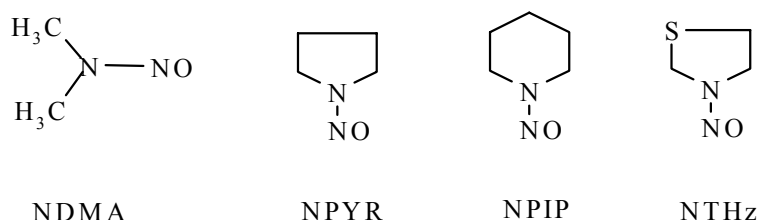


Abb. 1.2: Flüchtige *N*-Nitrosamine in Lebensmitteln

Nicht-flüchtige *N*-Nitrosamine (non-volatile *N*-nitrosamines, NVNA) haben Siedepunkte $> 130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sie lassen sich nicht durch destillative Techniken isolieren. Die bekanntesten Vertreter sind *N*-nitrosierte Derivate von Aminosäuren z.B. *N*-Nitrosoprolin (NPRO), *N*-Nitroso-thiazolidin-carbonsäure (NTCA), *N*-Nitrososarcosin (NSAR) und Kondensationsprodukte aus Aminosäuren und Aldehyden, z.B. *N*-Nitroso-(2-hydroxy)-thiazolidin (NHMTHz), *N*-Nitroso-(2-hydroxymethyl)-thiazolidin-carbonsäure (NHMTCA) und kommen in Konzentrationen von 0,01 bis mehreren mg/kg vor. NVNA können beim Kochen oder Braten durch Decarboxylierung in VNA umgewandelt werden [44,47-55]. Die wichtigsten Vertreter zeigt Abb. 1.3.

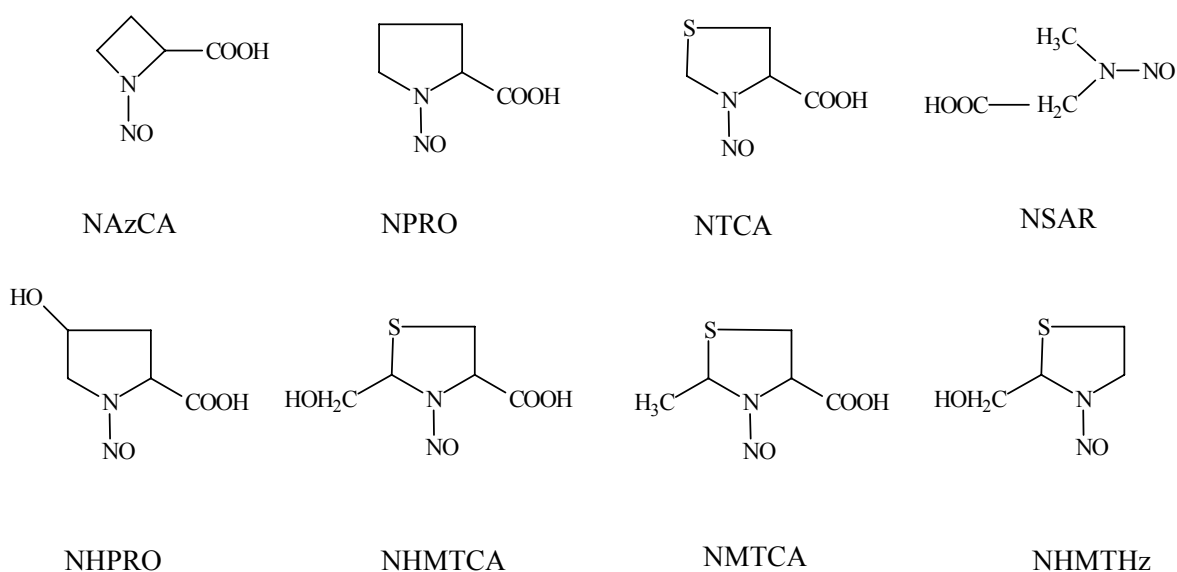


Abb. 1.3: Ausgewählte Vertreter der NVNA in Lebensmitteln

Schätzungen gehen von einer Gesamtaufnahme von $1,1\text{ }\mu\text{mol/Tag}$ aus. Dabei entfallen auf die Nahrung 72 % ($0,79\text{ }\mu\text{mol/Tag}$), auf das Rauchen 2 % ($0,02\text{ }\mu\text{mol/Tag}$), sowie auf sonstige Quellen 26 % (Medikamente, Kosmetika, Arbeitsplatz: $0,15\text{-}0,30\text{ }\mu\text{mol/Tag}$) [38]. Dem gegenüber steht eine Gesamtausscheidung an *N*-Nitrosoverbindungen bei gesunden Erwachsenen von $1,30 \pm 1,05\text{ }\mu\text{mol/Tag}$ im Urin und zwischen $1,56 \pm 1,56$ und $3,17 \pm 2,58\text{ }\mu\text{mol/Tag}$ in den Faeces. Die erhebliche Differenz zwischen Aufnahme und Ausscheidung zeigt, dass 45 - 75 % der Exposition mit *N*-Nitrosaminen endogen erfolgt.

Von den bekannten Verbindungen spielen *N*-Nitrosamino-säuren bei der Aufnahme und Ausscheidung mengenmäßig die größte Rolle. Einige von ihnen kommen im ppm Maßstab (mg/kg) in Lebensmitteln vor. Es ist nicht auszuschließen, dass sie die Quelle für gesundheitsgefährdende Abbauprodukte in Lebensmitteln oder für mutagene bzw.

kanzerogene Metaboliten im Organismus sind. Lutz [56] gibt als tägliche *N*-Nitrosamin-Aufnahmemenge allerdings nur 14 ng/Tag an, die zu acht Tumorindikationen pro 1 Million Personen führen sollen.

Sekundäre Amine in der Nahrung kommen als Vorstufen für Dialkylnitrosamine in Frage, da sie nach Abb. 1.7 im sauren Milieu des Magens nitrosiert werden können. Das Auftreten der sekundären Amine Dimethylamin, Pyrrolidin und Piperidin korrespondiert mit dem Auftreten der entsprechenden *N*-Nitrosoverbindungen [42]. In Fisch werden Konzentrationen von bis zu 160 mg/kg Dimethylamin (DMA) gefunden, während Methyl-ethylamin nur selten gefunden wird, und dann auch nur in sehr geringen Konzentrationen (< 1 mg/kg Fisch). Neben Methylamin stellt Trimethylaminoxid die wichtigste Quelle für DMA dar, das durch die Trimethylaminoxidase zu DMA abgebaut wird. Weitere wichtige Quellen sind Fleisch (0,2 – 20 mg/kg), Brot (3,9 – 5,3 mg/kg), Gemüse (0,01 – 37 mg/kg) und Gewürze (bis zu 36 mg/kg). Die wichtigste Quelle für Pyrrolidin und Piperidin sind Gewürze (41 – 91 mg/kg bzw. 535 – 642 mg/kg). Die wichtigsten Vorstufen von Piperidin sind dabei die Geschmacksstoffe Perin, Piperanin und Piperylin [42]. Die höchste Konzentration an Diethylamin findet sich in Sojasauce (36 mg/kg). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die tägliche Gesamtaufnahme primärer Amine um den Faktor 4,5 höher ist als die sekundärer Amine, wobei die Aufnahme bei Männern aus verschiedenen Gründen höher ist als bei Frauen (37 mg/Tag bzw. 29 mg/Tag) [42].

Acrylnitril (ACN, Abb. 1.4) ist ein wichtiger Grundstoff für die Herstellung von Kunststoffen (z.B. Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymere) und Kunstfasern (z.B. Polyacryl-Fasern). Außerdem wird es als Insektengift eingesetzt. Synthetisiert wird es hauptsächlich aus Acetylen und Blausäure.



Abb. 1.4: Strukturformel von ACN

Eine Belastung durch Acrylnitril und eine damit verbundene mögliche cyanoethylierende Wirkung erfolgt fast ausschließlich an Arbeitsplätzen in der chemischen Industrie. Eine endogene Bildung aus dem C2-Pool ist in der Literatur nicht beschrieben. Für Arbeiter in der acrylnitrilverarbeitenden Industrie wurde in Deutschland ein Grenzwert von 3 ppm festgelegt, die sog. Technische Richtkonzentration (TRK-Wert) [57]. Bei einem durchschnittlichen

Atemvolumen von 10 m^3 pro Stunde, wie es bei starker körperlicher Belastung erreicht werden kann, einer Exposition von 10 h und 100 %-iger Resorption ergeben sich 71 mg aufgenommenes ACN pro Schicht. Acrylnitril wird in Umgebungsluft sehr schnell abgebaut, in Wasser etwas langsamer (1 – 2 Wochen) [58]. Die in der Luft gemessenen Konzentrationen in der Nähe acrylnitrilverarbeitender Betriebe liegt generell bei $< 10 \text{ ppb}$ [58].

Ethylenoxid ist ein wichtiger chemischer Grundstoff für eine Vielzahl von Synthesen, darunter Ethylenglykol. Wie bei Acrylnitril sind auch für Ethylenoxid keine weiteren exogenen Quellen außer einer Exposition am Arbeitsplatz bekannt. Allerdings wird Ethylenoxid im Körper endogen gebildet, vor allem aus Ethylen [59]. Weitere mögliche endogene Quellen sind Lipidperoxidation [60], Oxidation von freiem Methionin [61,62] oder von Häm [63]. Diese endogenen Quellen tragen zu einem Backgroundlevel 2-hydroxyethylierter physiologischer Makromoleküle wie DNA, Hämoglobin und Albumin bei [64].

Acrolein (Abb. 1.5) wird als Ausgangsmaterial für die Synthese von Acrylsäure und Acrylaten, Methionin, Allylalkohol und Glycerol verwendet. Es findet sich in Umgebungsluft (ländlich: $1\text{--}5 \text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$; städtisch: $5\text{--}20 \text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$) und in Automobilabgasen ($0,05\text{--}27,7 \text{ mg}/\text{m}^3$).

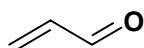


Abb. 1.5: Strukturformel von Acrolein

Vergleicht man die Belastung eines Rauchers, der 20 Zigaretten ($50\text{--}100 \text{ }\mu\text{g}$ Acrolein/Zigarette entsprechend $1000\text{--}2000 \text{ }\mu\text{g}/\text{Tag}$) am Tag raucht mit einer typischen ETS-Belastung ($10\text{--}20 \text{ }\mu\text{g}$ Acrolein/ m^3 ; 3 h Exposition/Tag bei $1 \text{ m}^3/\text{h}$ Atemvolumen entsprechend $30\text{--}60 \text{ }\mu\text{g}/\text{Tag}$), errechnet sich eine 33 mal höhere Aufnahme an Acrylnitril durch Aktivrauchen als durch Passivrauchbelastung. Da ein Endprodukt der Lipidperoxidation Acrolein ist [65,66], und Rauchen diese erhöht, sind Raucher zusätzlich durch eine endogene Bildung von Acrolein belastet. Acrolein kann zusätzlich durch metabolische Aktivierung verschiedener allylischer Verbindungen sowie als Stoffwechselprodukt des Zytostatikums Cyclophosphamid gebildet werden. Darüber hinaus

kommt es in Nahrungsmitteln vor, vor allem in Früchten ($< 10 - 50 \mu\text{g/kg}$), Gemüse (bis zu $60 \mu\text{g/kg}$), Käse ($290 - 1300 \mu\text{g/kg}$) und Rotwein (bis zu $3,8 \text{ ng/l}$) [67].

Obwohl mengenmäßig nur von untergeordneter Bedeutung, ist die Aufnahme von Ethylcarbamat (Urethan, Abb. 1.6) als mögliche Quelle für ethylierende Spezies von Bedeutung.

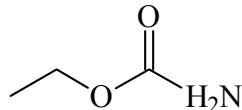


Abb. 1.6: Struktur von Ethylcarbamat

Urethan kommt vor allem in Brot vor ($3 - 15 \mu\text{g/kg}$), häufig auch in Wein ($> 10 \mu\text{g/kg}$), auch Bier und Joghurt werden als Quellen diskutiert [7]. Die höchsten Konzentrationen werden in Steinobstbranntweinen gefunden ($200 - 20200 \mu\text{g/kg}$), was auf eine Reaktion von Ethanol mit Isocyanensäure unter Einfluss des Sonnenlichtes zurückzuführen sein dürfte. Die durchschnittliche tägliche Belastung (ohne alkoholische Getränke) wird auf 20 bis 4300 ng/kg Körpergewicht geschätzt, was einer Gesamtaufnahme von bis zu $300 \mu\text{g}$ entspricht [7].

1.2 Metabolismus der Alkylanzien-Vorläufer

Für einige ausgewählte Vorläufersubstanzen alkylierender Spezies werden die zugrundeliegenden Metabolismen vorgestellt.

Die klassische Synthese, die zur Bildung eines *N*-Nitrosamins führt, ist die Umsetzung eines sekundären Amins mit salpetriger Säure, die aus Nitrit unter sauren Bedingungen gebildet wird [68-70]. Salpetrige Säure oder Nitrit sind für sich betrachtet keine nitrosierenden Agenzien, sondern stellen reaktive Zwischenstufen bei der Bildung von Distickstofftrioxid (N_2O_3), Distickstofftetraoxid (N_2O_4), Nitrosylhalogeniden (NOX) und protonierter salpetriger Säure dar ($\text{H}_2\text{O}^+\text{NO}$), die im wässrig sauren Medium miteinander im Gleichgewicht stehen (Abb. 1.7). Die Bildung der protonierten salpetrigen Säure ist verantwortlich für das Entstehen von nitrosierenden Agenzien *in vivo*, besonders im aciden Milieu des Magens. Da

das freie Amin und nicht das protonierte Amin nitrosiert wird, beeinflussen die Basizität desamins und der pH-Wert des Mediums die Nitrosaminbildung. Salpetrige Säure hat einen pK_a -Wert von 3,35. Der optimale pH-Wert für die Nitrosierung von sekundären Aminen liegt somit bei 3,0 - 3,5. Primäre Amine stehen im allgemeinen als Vorstufen für *N*-Nitrosoverbindungen nicht zur Verfügung, weil die Nitrosierungsprodukte sofort via Diazotierung und nucleophiler Substitution der Aminogruppe weiterreagieren, so dass eine Vielzahl von Folgeprodukten entsteht [71,72].

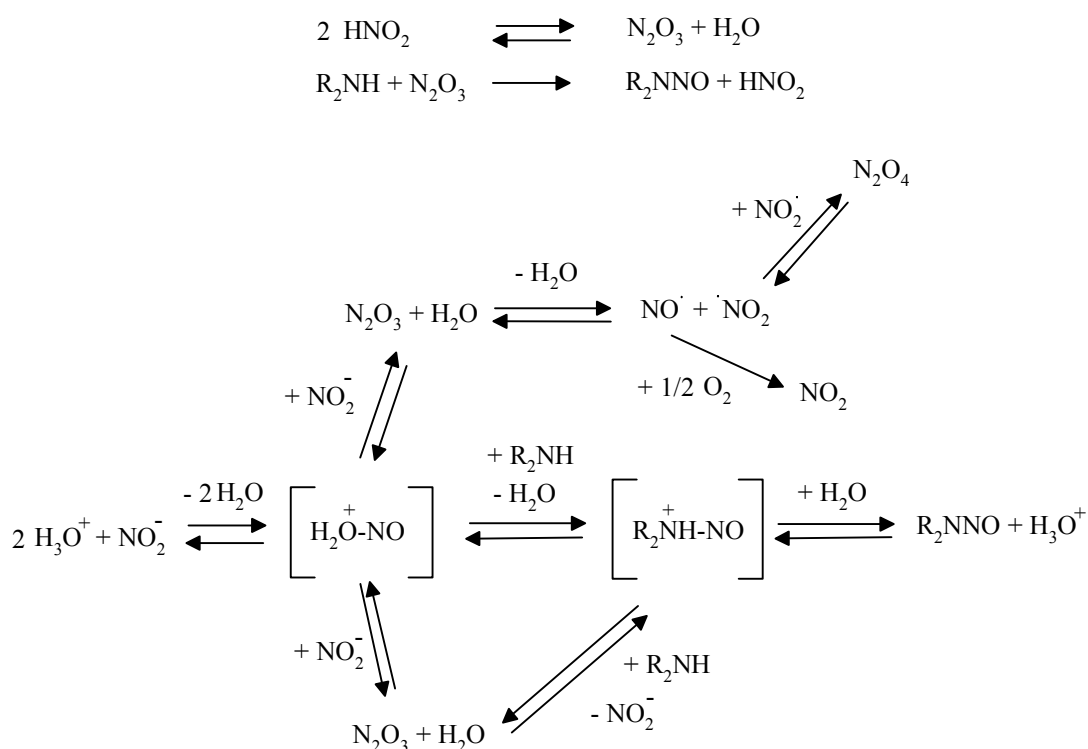


Abb. 1.7: Gleichgewichtsreaktionen von sek. Aminen mit Nitrit in wässrig saurem Medium

Einfache symmetrische Trialkylamine reagieren langsam mit salpetriger Säure; für komplexere Verbindungen lassen sich keine systematischen Vorhersagen treffen, welcher Alkylsubstituent durch nitrosierende Dealkylierung ersetzt wird. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung der tabakspezifischen *N*-Nitrosamine (TSNA) 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal (NNAL), *N*-Nitrosornikotin (NNN) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) aus Nikotin [73,74]. Nikotin reagiert in wässriger Lösung mit salpetriger Säure unter Öffnung des Pyrrolidinringes und Bildung des korrespondierenden sekundären

Amins. Elektrophile Addition des Nitrosoniumions und anschließende Abspaltung von hyposalpetriger Säure führt zum cyclischen Iminiumion. Dieses wird zum sekundären Amin hydrolysiert und nitrosiert [75]. NNK und NNN reagieren nach α -Hydroxylierung weiter zu reaktiven Metaboliten, die Addukte bilden können (Abb. 1.8).

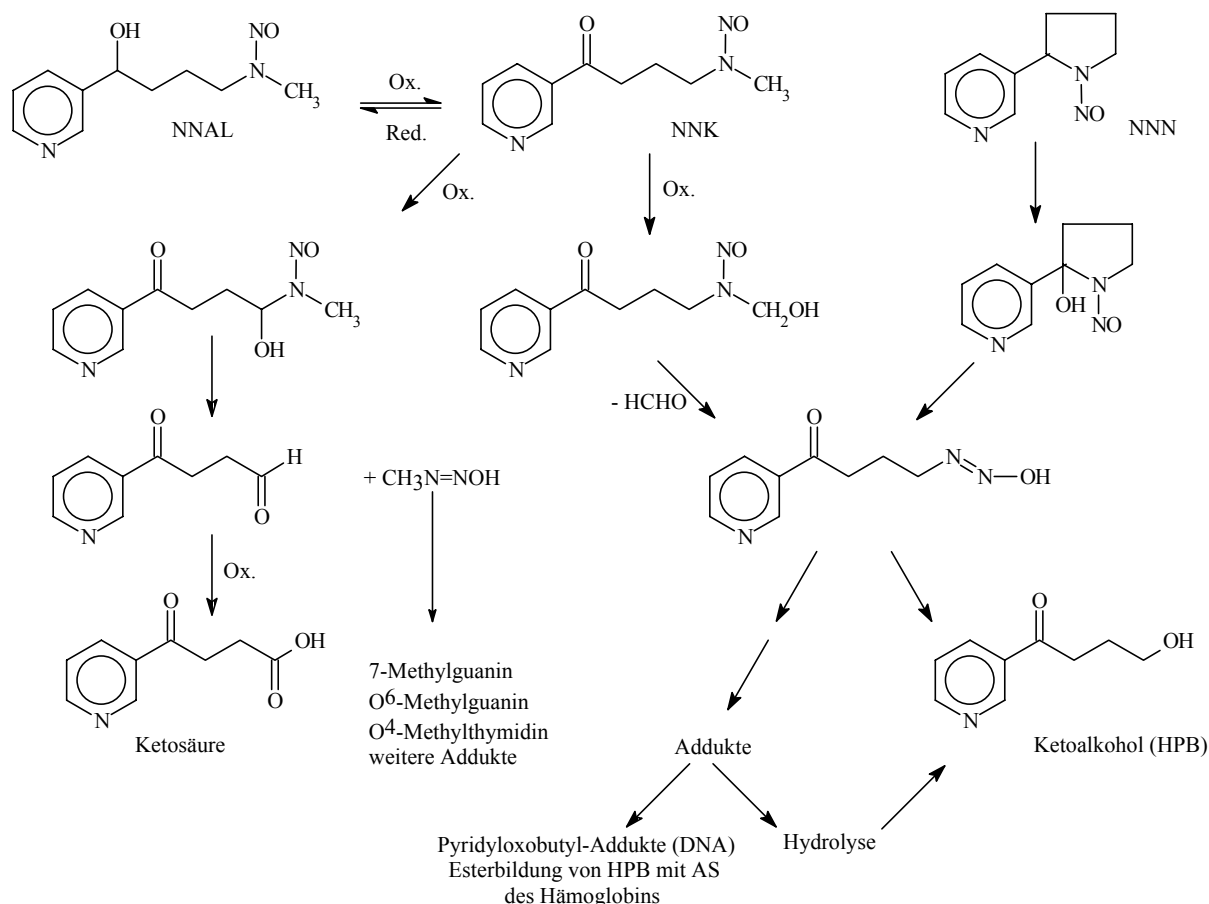


Abb. 1.8: Metabolismus von NNK und NNN

Bei Anwesenheit von Katalysatoren können *N*-Nitrosamine auch unter neutralen oder alkalischen Bedingungen gebildet werden [76,77]. So dienen Formaldehyd und Alkohole als Katalysatoren im alkalischen Medium. Ebenso gut sind alle Stoffe, die mit salpetriger Säure schneller reagieren als Amine potentielle Inhibitoren der *N*-Nitrosaminbildung [78]. L-Ascorbinsäure und L-Ascorbat-Ionen verhindern die Nitrosierung von Aminogruppen durch Abfangreaktionen mit N_2O_3 , $\text{H}_2\text{O}^+\text{NO}$ und NOX . Dabei wird Ascorbinsäure irreversibel zu Dehydroascorbinsäure oxidiert und die nitrosierende Spezies zu NO reduziert [79].

N-Nitrosamine stellen sogenannte Präkanzerogene dar, d.h. sie müssen zunächst metabolisch aktiviert werden. Der klassische Weg führt über eine α -C-Hydroxylierung durch mikrosomale

Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen zu einem proximalen Kanzerogen, dem α -Hydroxy-nitrosamin. Das instabile Zwischenprodukt geht unter Aldehydabspaltung in ein Monoalkyl-nitrosamin über, das spontan zum Diazohydroxid tautomerisiert. Das unter formaler OH-Abspaltung entstehende Alkyldiazoniumion zerfällt unter N_2 -Abspaltung zum Carbeniumion, das als ultimates Karzinogen bezeichnet wird. Als Elektrophil reagiert es mit nucleophilen Zentren von Biomolekülen (DNA, RNA, Proteine) zu stabilen Addukten, die im Falle von DNA, einen genotoxischen Effekt auslösen können. In Abbildung 1.9 ist der Mechanismus schematisch für Dialkylnitrosamine dargestellt.

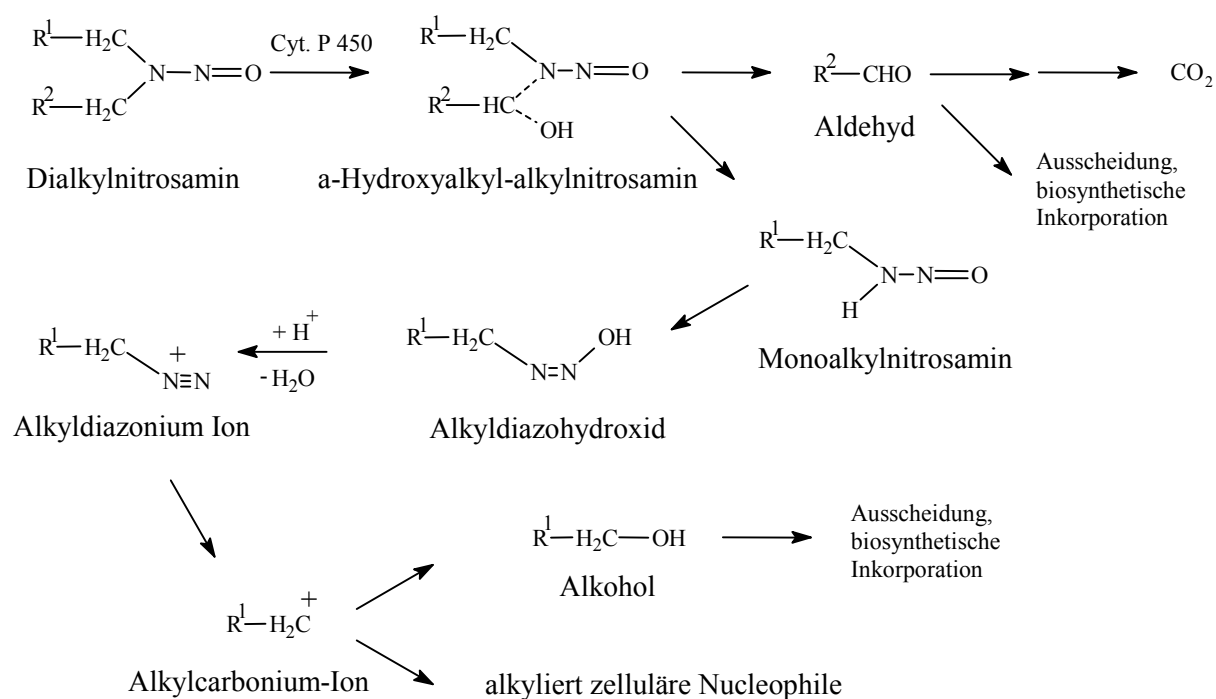


Abb. 1.9: Schematischer Metabolismus von Dialkylnitrosaminen (modifiziert nach Schmähl [80])

Cyclische *N*-Nitrosamine werden nach einem analogen Abbaumechanismus verstoffwechselt, wie in Abb. 1.10 schematisch für *N*-Nitrosopyrrolidin gezeigt.

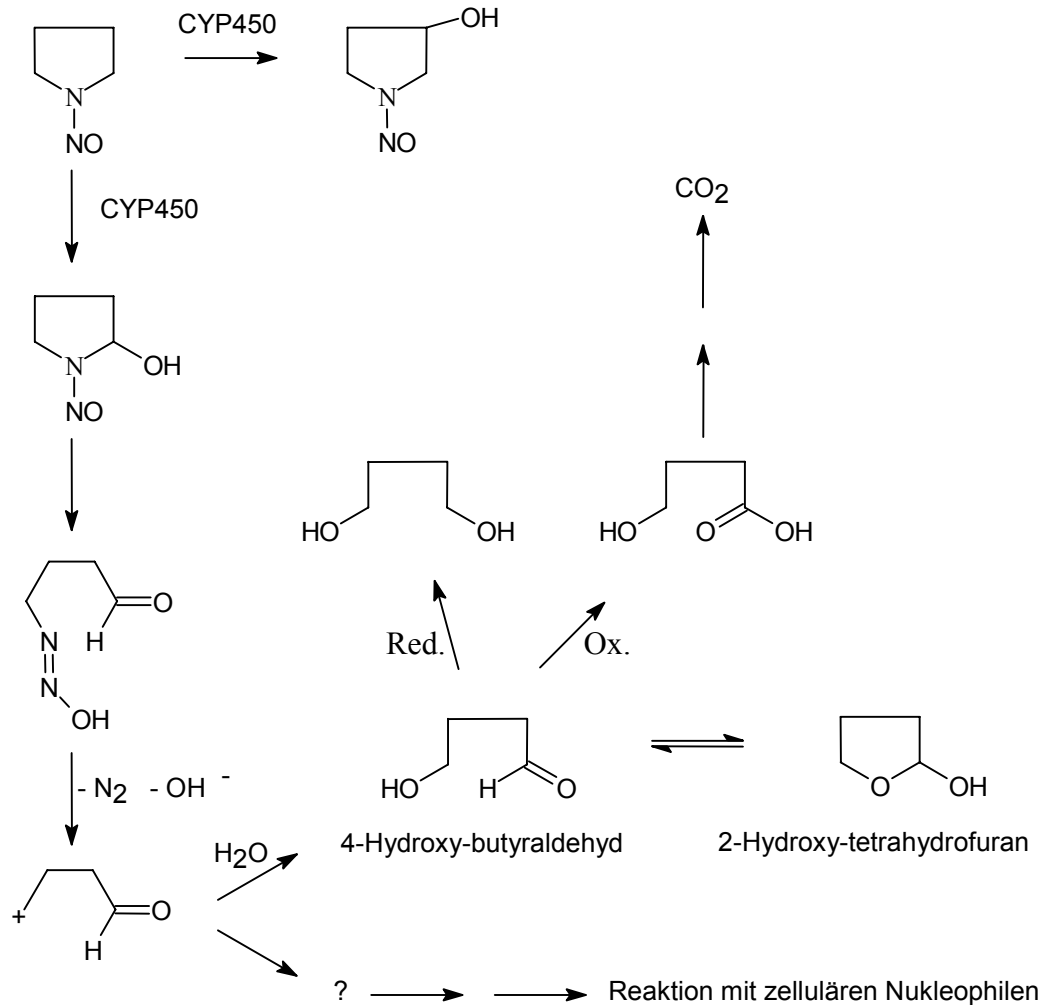


Abb. 1.10: Metabolismus cyclischer *N*-Nitrosamine am Beispiel von NPYR (modifiziert nach Schmähl [80])

Im Falle des Acrylnitrils (ACN) erfolgt eine rasche Resorption nach oraler, dermalen und inhalativer Aufnahme. Der Stoff ist akut giftig und führt zu ähnlichen Vergiftungssymptomen wie eine Blausäurevergiftung. Bei einer akuten Intoxikation weisen die klinischen Symptome auf eine starke Stimulation des parasympathischen Nervensystems hin [81]. Nach der Aufnahme wird ACN im Körper metabolisiert (Abb. 1.11). Ein Teil des aufgenommenen ACN wird abgeatmet oder über den Urin unverändert ausgeschieden [82]. Ein weiterer Teil konjugiert enzymatisch oder nichtenzymatisch mit Glutathion und wird weiter umgebaut zu N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-cystein, der cyanoethylierten Mercaptursäure, die über den Urin ausgeschieden wird. Diese Mercaptursäure stellt beim Menschen den Hauptmetaboliten dar, mit einem Anteil von ca. 25 % der Gesamtausscheidung des aufgenommenen ACN. Ein Teil durchdringt schließlich die Erythrozytenmembran und kann im Zellinneren mit verschiedenen

Aminosäuren des Hämoglobins (z.B. N-terminales Valin, Cystein) oder bei anderen Zellen mit der DNA Addukte bilden. Nur ein kleiner Teil wird zum Epoxid oxidiert und entweder nach Abspaltung der Cyano-Gruppe als Blausäure (HCN), als Thiocyanat über den Urin ausgeschieden oder es werden nach Reaktion mit GSH hydroxylierte Mercaptursäuren gebildet, die ebenfalls im Urin ausgeschieden werden.

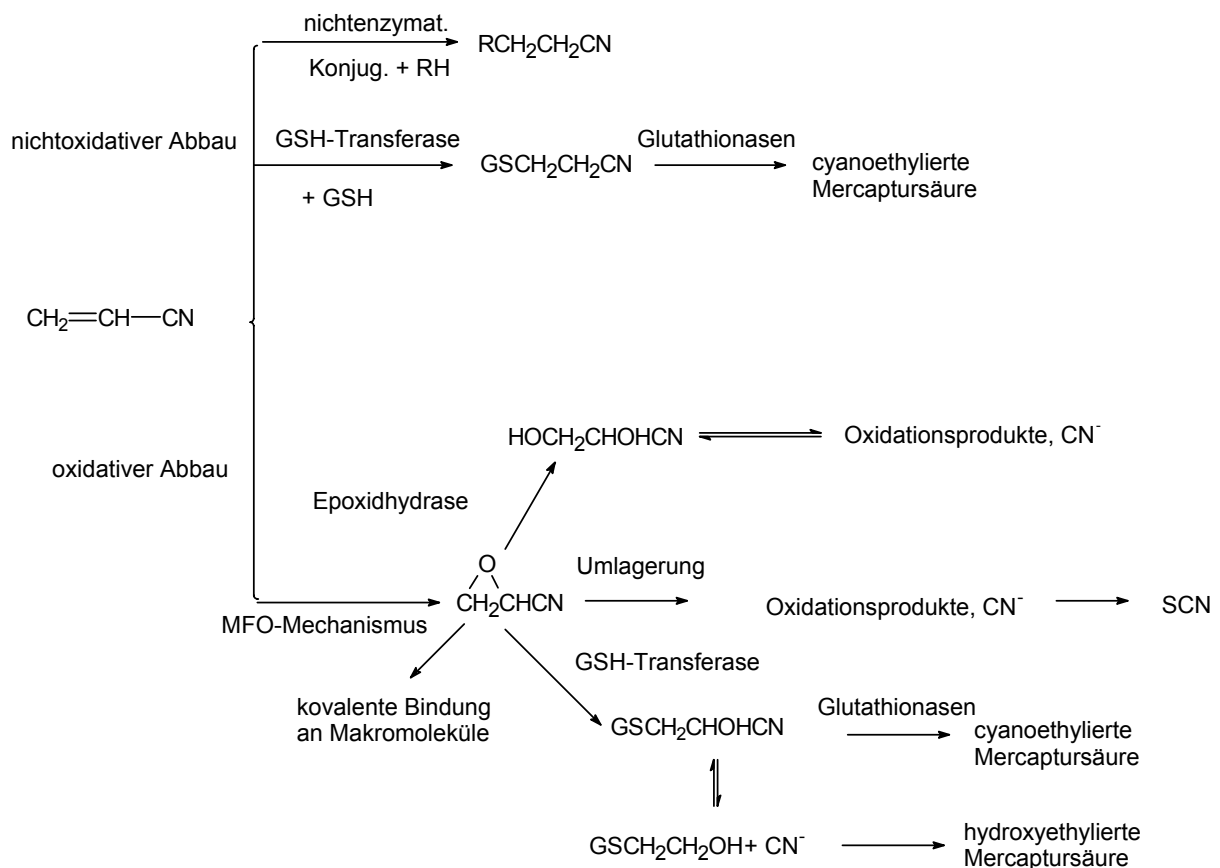


Abb. 1.11: Metabolismus von ACN (schematisch nach [82])

Lewalter [82] stellt in einer Untersuchung an 28 Arbeitern, die regelmäßig Kontakt mit Acrylnitril hatten, fest, dass ca. 5 % der untersuchten Personen keine Entgiftung über die Mercaptursäure aufwiesen und dadurch eine um mehr als 100 % höhere Konzentration an HCN hatten als ein normaler Raucher (Normalwert für Raucher 200 $\mu\text{g/l}$ Blut). Bei einer zweiten Studie mit 360 Nichtrauchern, die keinen regelmäßigen Kontakt mit ACN hatten, erhielt Lewalter die gleichen Ergebnisse.

Er erklärt dies mit der Inaktivierung einer speziellen Glutathion-Transferase. Statt dessen erfolgt bei den untersuchten Personen verstärkt eine Epoxidierung durch multifunktionale Oxidasen.

Ethylenoxid ist auf Grund der hohen Reaktivität des Oxiranringes zu raschen Reaktionen mit Makromolekülen befähigt [83]. Als ein mögliches Entgiftungsprodukt entsteht dabei nach Reaktion mit Glutathion die entsprechende Hydroxyethyl-mercaptursäure (Abb. 1.12).

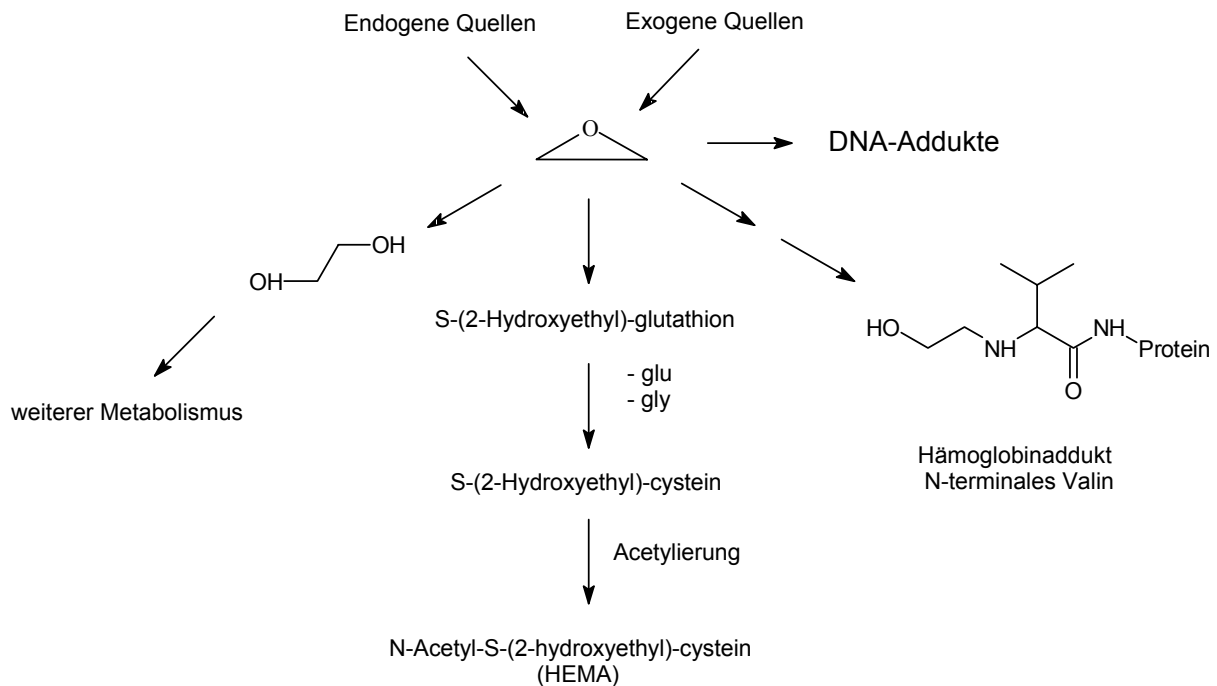


Abb. 1.12: Metabolismus von Ethylenoxid (schematisch nach [64])

Die Hauptmetaboliten des Acroleins werden über schnelle Reaktionen mit Thiolen wie Glutathion gebildet [84]. Teilweise werden diese Reaktionen von Glutathion-S-Transferasen katalysiert. Acrolein bindet auch an die Enzyme selbst, ebenso wie an andere nucleophile Zentren in Proteinen (Sulphydryl-Gruppen, Amino-Gruppen) [67]. Von den identifizierten Urinmetaboliten ist die 3-Hydroxypropylmercaptursäure (HPMA) mit einem Anteil von 20 - 80 % der aufgenommenen Gesamtdosis der bedeutendste Metabolit.

Das Metabolismusschema von Acrolein ist in Abb. 1.13 dargestellt.

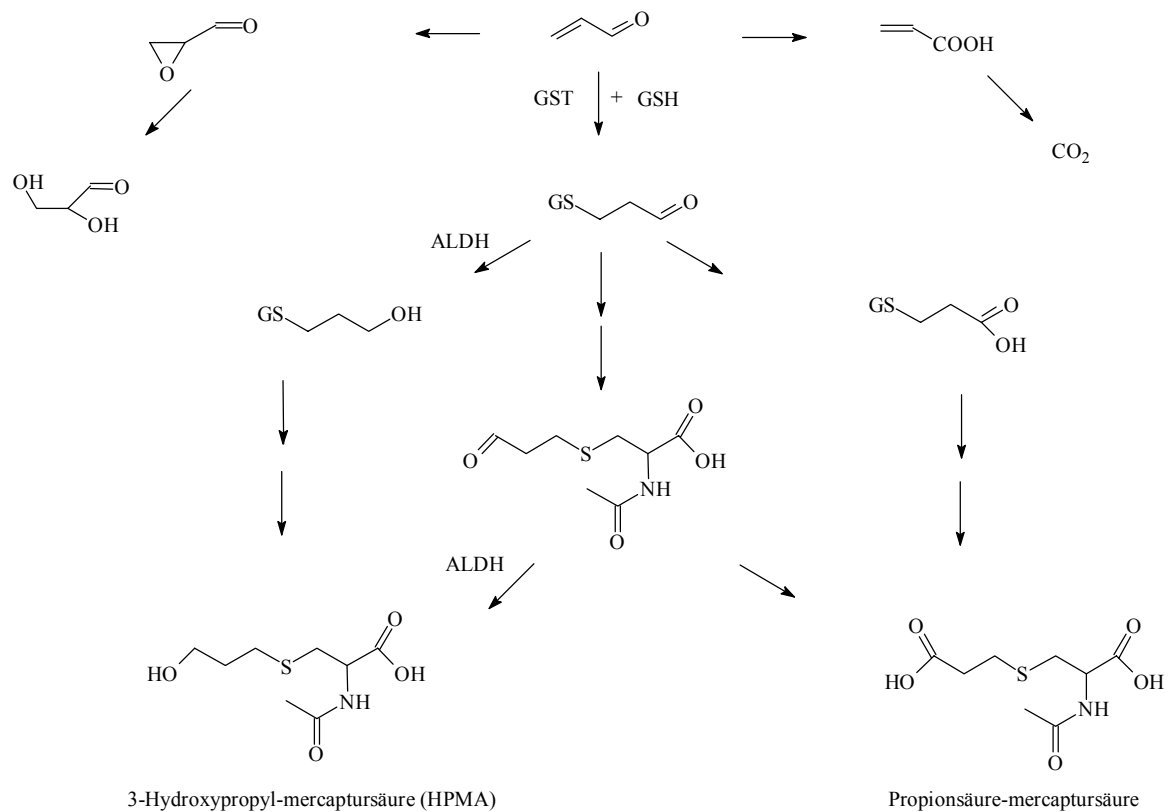


Abb. 1.13: Metabolismus von Acrolein (schematisch nach [85,86])

Ethylcarbamat wird in Nagetieren auf zwei verschiedenen Wegen metabolisiert. Die Hauptmetaboliten sind Ethanol, Ammoniak und Kohlendioxid nach Hydrolyse durch mikrosomale Esterasen und Amidasen mit einem Anteil von mehr als 90 % der aufgenommenen Gesamtdosis [87]. Diese Metaboliten stellen klassische Entgiftungsprodukte dar. Die zweite Möglichkeit der Verstoffwechslung führt zu einer Aktivierung über eine Oxidation des Ethylcarbamats durch CYP2E1 zu 2-Hydroxyethylcarbamate, *N*-Hydroxyethylcarbamate und Vinylcarbamate, das anschließend durch eine Epoxidierung in das ultimale Kanzerogen Vinylcarbamate-Epoxid umgewandelt wird (Abb. 1.14) [87-89].

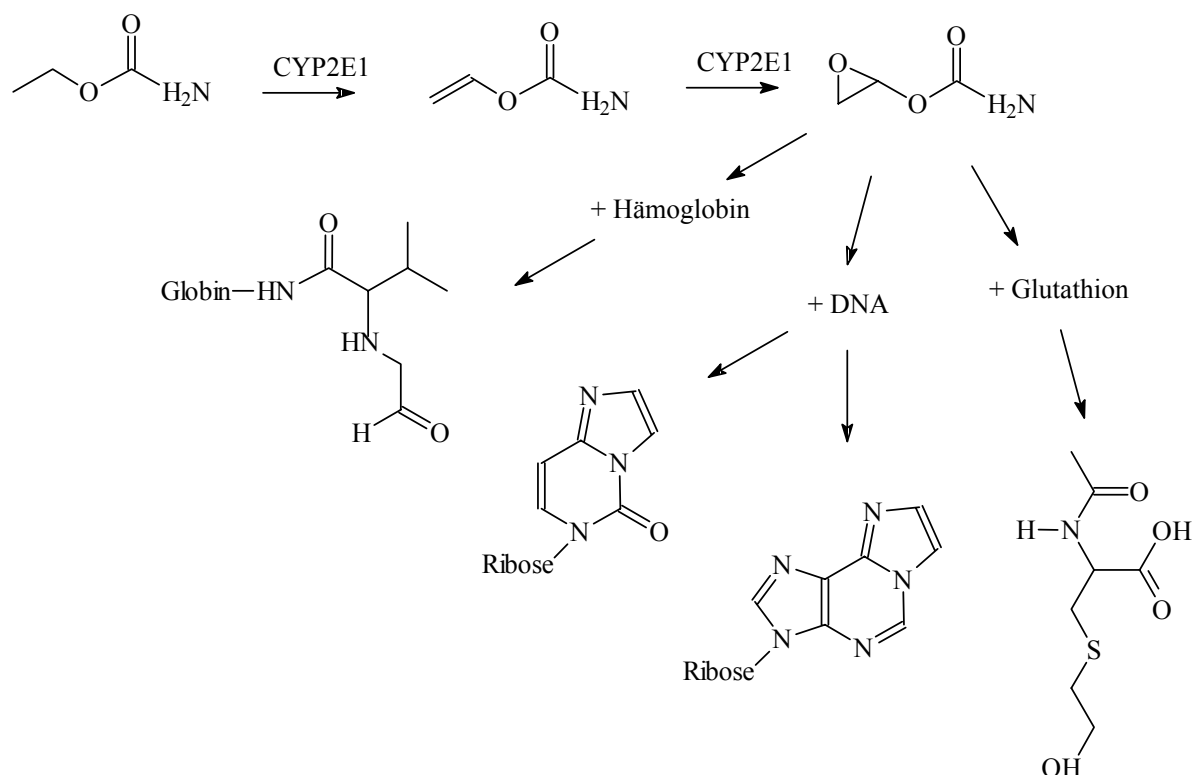


Abb. 1.14: Metabolismus von Ethylcarbamate (modifiziert nach [89])

Bei Reaktion mit der DNA können 2 Addukte entstehen, 3,N⁴-Ethenodeoxycytidin und 1,N⁶-Ethenodeoxyadenosin [90]. Durch die Reaktion mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins entsteht das N-(2-Oxoethyl)-valinaddukt. Etwa 0,13 % der aufgenommenen Dosis werden beim Menschen zu Ethylmercaptursäure verstoffwechselt [91].

1.3 Metabolischer Polymorphismus und Suszeptibilität

Um die Akkumulation (gen)toxischer Xenobiotika in ihren Zellen zu vermeiden, haben die Organismen Wege entwickelt, diese Substanzen wieder zu eliminieren. Viele metabolisierende Enzyme mit unterschiedlichen und teilweise überlappenden katalytischen Eigenschaften spielen bei diesem Eliminationsprozess eine entscheidende Rolle. Weil viele Kanzerogene Substrate dieser fremdstoffmetabolisierenden Enzyme sind, ist es nicht verwunderlich, dass Menschen auf Grund ihrer genetischen Prädisposition unterschiedliche Aktivierungs- bzw. Inaktivierungskapazitäten aufweisen. Die Analyse der genetischen Variabilität hat gezeigt, dass einige Vertreter der Superfamilien der Cytochrome P450, der

Glutathion-S-Transferasen und der N-Acetyltransferasen eine wichtige Rolle bei der chemisch-induzierten Kanzerogenese spielen.

Die Cytochrome P450 (CYP) stellen mit über 500 Vertretern das klassische Enzymsystem dar, das Phase-I-Oxidationsreaktionen katalysiert [92], allerdings scheinen nur die ersten drei Familien eine signifikante Rolle bei der Entstehung von Kanzerogenen zu spielen [93]. Hervorzuheben im Zusammenhang mit alkylierenden Spezies ist das CYP1A2, das vornehmlich in der Leber exprimiert wird und neben der Hydroxylierung heterocyclischer Arylamine auch die von Nitrosaminen katalysiert. Es wurden zwar noch keine Polymorphismen dieses Enzyms auf Genebene gefunden, doch ausgehend vom Standardsubstrat, Coffein, zeigen sich große inter-individuelle Unterschiede in seiner *in-vivo* Aktivität (Phänotyp). Diese Unterschiede werden auf induzierende Faktoren wie Nahrung oder Rauchen zurückgeführt [93,94]. Die CYP2-Familie ist die größte der CYP-Enzymfamilien, mit unterschiedlichen Subfamilien, deren Vertreter sich durch ein breites Substratspektrum auszeichnen, das nicht nur zwischen den einzelnen Subfamilien unterschiedlich ist, sondern auch innerhalb einer Subfamilie große Variabilitäten zeigt [92]. CYP2A6, das vornehmlich in der Leber exprimiert wird, scheint das wichtigste Enzym des Nikotinstoffwechsels zu sein [95,96], außerdem katalysiert es den Stoffwechsel einer Reihe von Nitrosaminen, darunter NNK und NDEA [97-99]. Bei Individuen mit einer verminderten CYP2A6-Aktivität lässt sich ein abgeschwächter Nikotinstoffwechsel feststellen, so dass diese Menschen besser vor einer Nikotin-Abhängigkeit geschützt sind [100]. Ähnliche katalytischen Eigenschaften finden sich auch bei CYP2E1 (NNK) und CYP3A4 (NNN) [74,101], allerdings wird bei Kaukasiern kein Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Genotyp berichtet [100].

Als ein Ergebnis des Phase-I-Metabolismus entsteht eine Reihe von hochreaktiven, elektrophilen Spezies, die am effizientesten detoxifiziert werden können, indem sie mit reduziertem Glutathion direkt oder durch Katalyse mittels Glutathion-S-Transferasen reagieren. Von diesen zwanzig verschiedenen Enzymen wird die Klasse *mu* (GSTM) vor allem in der Leber exprimiert, allerdings tritt bei diesem Enzym auf Grund einer Deletion ein Polymorphismus auf. Nur ca. 40 % kaukasischer Individuen weisen ein GSTM1-Allel auf. Die Level an 3- und 4-Aminobiphenyladdukten sind bei Trägern des GSTM1*0 Genotyps signifikant erhöht [102], ebenso wie die Rate des Schwester-Chromatidaustausches in Lymphozyten bei Rauchern [103]. Die Klasse *theta* (GSTT) teilt sich in zwei weitere Klassen auf, von denen GSTT1 einen Null-Polymorphismus zeigt [104], der für die unterschiedlichen Phänotypen bei der Verstoffwechslung von Methylhalogeniden verantwortlich sein soll.

Träger des GSTT1*0 Gens zeigen höhere Raten an Schwester-Chromatidaustausch bei Belastung mit Methylbromid, Ethylenoxid und Dichlormethan, verglichen mit Trägern des nicht-deletierten GSTT1-Gens [105]. Schröder et al. [106] berichten von einer weiteren *theta*-Klasse, die in menschlichen Erythrozyten für die Verstoffwechslung von Methylhalogeniden [107], Ethylenoxid und Dichlormethan [105] verantwortlich sein soll [108]. Expremiert werden die Klassen ansonsten vorwiegend in der Leber. Die GST *pi*-Klassen (GSTP) werden vorwiegend extra-hepatisch expremiert, zeigen neben polymorphen Formen auch Isoformen bei GSTP1 und sind im Fremdstoffmetabolismus verantwortlich für die Katalyse von Oxidationsprodukten der DNA. Sie werden mit dem vermehrten Auftreten von Blasen- und Prostatakrebs in Verbindung gebracht. In der deutschen Bevölkerung soll das GSTT1-Gen in 10 – 30 % und das GSTM1-Gen in 38 – 62 % defizient sein [109]. Bei geringer, umweltrelevanter Belastung mit Alkylantien werden im Phänotyp keine interindividuellen Variabilitäten der GST-Isoenzyme beobachtet. So konnten beim Nachweis der durch Ethylenoxid entstehenden Globinaddukte weder im Referenzbereich noch unter industriellen Belastungen gravierende Adduktdifferenzen festgestellt werden [9]. Die Korrelation der Mercaptursäure- und Globinaddukt-Spiegel verschiedener Alkylantien mit den Aktivitäten der genotypischen GST-Isoenzyme liefert unter moderaten Alkylantien-Belastungen weder auf der Einzel- noch der Gruppenbasis auffällige Zusammenhänge, die für eine Gefährdungsabschätzung nutzbar wären [9].

Eine weitere Möglichkeit des Phase-II-Metabolismus bei Menschen stellen die N-Acetyltransferasen NAT1 und NAT2 dar, die Acetyl-Gruppen auf mögliche Substrate übertragen. Die Vielfältigkeit der Substrate ist bei den Enzymen dieser Familie begrenzt und besteht hauptsächlich aus aromatischen und heterocyclischen Aminen und Hydrazinen.

1.4 Auswirkungen der Alkylierung

In Abb. 1.15 sind diejenigen Positionen in den beiden Basenpaaren der DNA dargestellt, an denen die entsprechenden Alkylierungen stattfinden können. Darüber hinaus sind Alkylierungen der Phosphat-Gruppen der DNA denkbar. Die Spezifität der Reaktion an den 18 denkbaren Positionen hängt von der reaktiven Spezies, der Nucleophilie der DNA-Position und sterischen Faktoren ab. Die Ringpositionen N3 und N7 des Adenins und Guanins zeichnen sich durch die größte Nucleophilie aus [110].

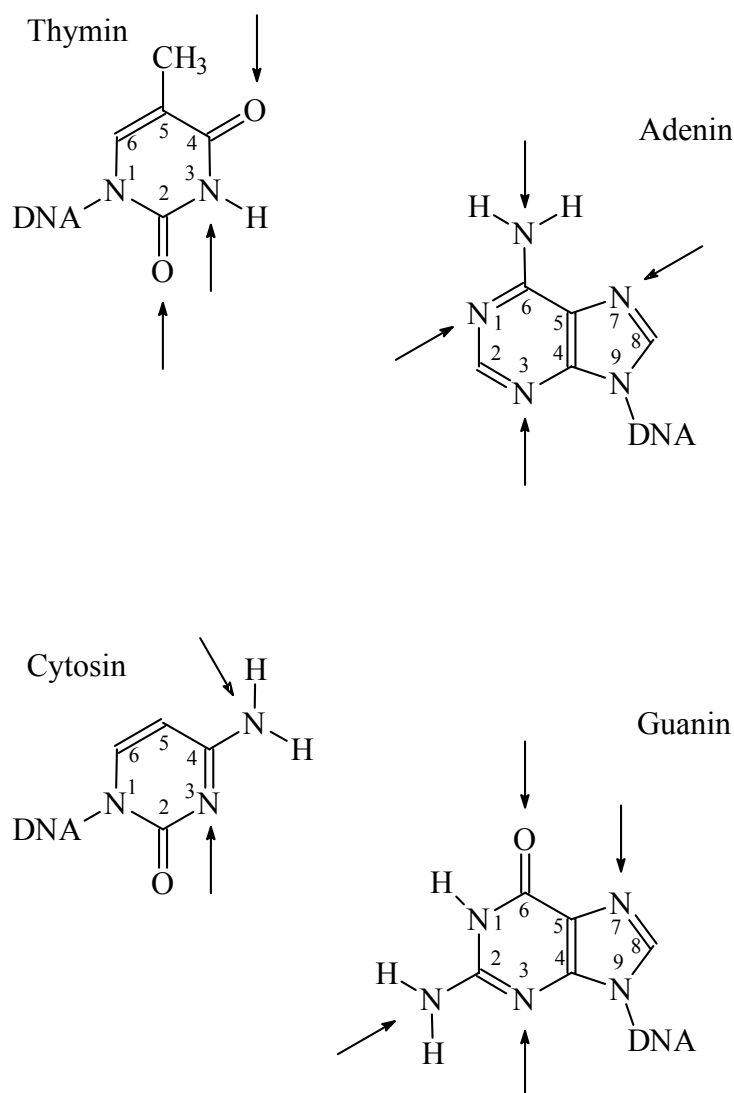


Abb. 1.15: Mögliche Alkylierungspositionen an den Basen der DNA

Alkylierende Agenzien reagieren mit der DNA an den meisten nucleophilen Stickstoff – und Sauerstoffzentren. Hochreaktive Elektrophile wie das Methyldiazonium-Ion (CH_3N_2^+), die wenig polarisierbar sind, zeigen vorzugsweise Reaktionen nach $\text{S}_{\text{N}}1$, während weniger reaktive Spezies wie beispielsweise Methyl-methansulfonat in den meisten Fällen an den Stickstoffatomen nach $\text{S}_{\text{N}}2$ reagieren und nur wenig Alkylierung an den Sauerstoffatomen zeigen [111-115].

In Proteinen, die als Surrogatmarker für DNA-Alkylierungen verwendet werden, sind ebenfalls mehrere Positionen denkbar. Neben der N-terminalen Aminosäure Valin kommen im Hämoglobin als weitere nucleophile Zentren Cystein (Sulfhydryl-Gruppe), Histidin (Imidazol-Ring), sowie Glutaminsäure und Aspartat (Säure-Gruppen) in Frage. Für einige

Biomarker bestehen gute Korrelationen zwischen dem Auftreten von DNA-Addukten und Proteinaddukten. Für einige Verbindungen können darüber hinaus *in vitro* und *in vivo*, in Tierversuchen oder durch epidemiologische Studien beim Menschen, Zusammenhänge mit späteren biologischen Effekten oder sogar klinischen Krankheitsbildern hergestellt werden, wobei sich die vorgestellten Alkylantien in ihren mutagenen, genotoxischen und daraus resultierenden klinischen Krankheitsbildern erheblich voneinander unterscheiden. Darüber hinaus existieren artspezifische Unterschiede [116-124].

1.4.1 *N*-Nitrosamine

Seit dem Bekanntwerden der leberkanzerogenen Wirkung von NDMA wurden mehr als 300 *N*-Nitrosoverbindungen im Tierversuch getestet, wobei etwa 90 % der geprüften Verbindungen Tumore in den Versuchstieren erzeugten. Die kanzerogene Wirkung einzelner VNA und TSNA ist in 39 Tierspezies nachgewiesen worden [125]. Darüber hinaus konnten mutagene [126,127] und teratogene Effekte beobachtet werden [128]. *N*-Nitrosamine zeichnen sich in ihrer Wirkung durch eine ausgeprägte Organotropie aus. Typische Zielorgane sind Gehirn, Nervensystem, Mundhöhle, Speiseröhre, Magen-Darmtrakt, Leber, Niere, Harnblase, Pankreas, Lunge und das hämatopische System. Die Wirkung wird meist nicht lokal, sondern systemisch entfaltet. Der direkte Nachweis einer kanzerogenen Wirkung beim Menschen steht zwar noch aus [129], doch *in vitro*-Untersuchungen ergaben, dass menschliche Leberzellen und Leberzellen von Ratten NDMA qualitativ identisch metabolisieren [130]. Mit Ausnahme von *N*-Nitrososarcosin (NSAR), das im Tierversuch toxisch und krebserregend wirkt [131,132], scheinen die übrigen NVNA wie NPRO, NHPRO, NTCA, NMTCA und NPIC biologisch inaktiv zu sein. Man kann davon ausgehen, dass die meisten *N*-Nitrosaminosäuren ähnlich wie NTCA, NMTCA und NPRO weitgehend unmetabolisiert und nahezu vollständig (> 95 %) innerhalb von 24 h im Urin ausgeschieden werden [38]. NSAR wird zu 88 % im Urin ausgeschieden, während NHPRO nahezu quantitativ (94 %) zu gleichen Teilen im Urin und den Faeces ausgeschieden wird [133]. Die Ausscheidung von NPRO im Urin kann nach definierter Gabe der Vorstufe Prolin als Marker für das individuelle endogene Nitrosierungspotential herangezogen werden [134]. So scheiden Raucher durchschnittlich mehr NPRO aus als Nichtraucher; dies scheint für NTCA ebenfalls zuzutreffen, wobei zusätzlich geschlechtsspezifische Unterschiede gemessen wurden [38]. Allerdings erlaubt die Ausscheidung von NPRO allein noch keinen Rückschluss auf mögliche

endogene Nitrosierung, da diese Substanz aus unterschiedlichen Quellen aufgenommen werden kann, denen Raucher und Nichtraucher ausgesetzt sein können. Von den tabakspezifischen Nitrosaminen ist NNK in allen getesteten Spezies ein potentes Lungenkanzerogen [135]. Bei Rauchern soll es signifikant zur Erhöhung der Lungenkrebsfälle [136,137] oder weiterer Krebsarten [138] beitragen, es bestehen jedoch Zweifel, ob dies wirklich zutreffend ist [139-141].

1.4.2 Acrylnitril

Acrylnitril ist von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft in die Kategorie 2 (im Tierversuch krebserzeugender Stoff) eingestuft worden. Bei Ratten wurden Gehirn- und Magentumore nach Exposition mit Acrylnitril festgestellt. Die kanzerogene Wirkung auf den Menschen konnte allerdings noch nicht einwandfrei nachgewiesen werden. Es wurden bereits mehrere epidemiologische Untersuchungen zur krebserzeugenden Wirkung von Acrylnitril beim Menschen durchgeführt. Bei einigen dieser Studien wurde eine erhöhte Anzahl an Lungen- und Prostatakrebserkrankungen festgestellt. Zusätzlich wurde Acrylnitril mit „H“ in der MAK-Liste (Maximale Arbeitsplatzkonzentration) gekennzeichnet aufgrund der Gefahr der Hautresorption. Als TRK-Wert (Technische Richtkonzentration) wird 3 ppm (= 7 mg/m³) und als EKA-Wert (Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe) 420 µg/l Blut für N-Cyanoethylvalin angegeben [142]. Einige *in vitro*-Studien liefern Anzeichen für ein mutagenes Potential des Acrylnitril. Es werden neben Basenpaar-Substitutionen in verschiedenen Teststämmen (TA 100, TA 102, TA 1530, TA 1535, TA 1950, alles Stämme von *Salmonella typhimurium*) auch Genmutationen, Chromosomenaberrationen, Schwester-Chromatid-Austausch (SCE) und Zelltransformationen beobachtet, allerdings nur nach vorheriger metabolischer Aktivierung [58]. Teratogene Eigenschaften werden bei Ratten und Hamstern abhängig von der Dosis und der Art der Aufnahme nachgewiesen, bei Menschen sind die Ergebnisse einer Studie in China zumindest insofern zweifelhaft, als das untersuchte Kollektiv von Arbeiterinnen auch weiteren Chemikalien ausgesetzt war [58]. Dennoch ist beim Menschen eine teratogene Wirkung nicht auszuschließen.

1.4.3 Ethylenoxid

Meist durch Inhalation, jedoch auch nach resorptiver Aufnahme von gasförmigem Ethylenoxid oder entsprechenden Lösungen über die Haut führt Ethylenoxid zu Vergiftungen. Es ist ein direkt wirkendes Alkylierungsmittel, das einen sensitiven, dosisabhängigen Anstieg der Chromosomen-Aberrationen und der Schwester-Chromatid-Austauschrate in peripheren Lymphozyten sowie die Micronuclei-Bildung in Knochenmarkzellen exponierter Arbeiter induziert [64,143]. Es wird mit dem Auftreten akuter myeloischer Leukämien in Zusammenhang gebracht [7]. Außerdem treten Genmutationen und vererbare Translokationen in Stammzellen exponierter Affen auf [64]. Der TRK-Wert beträgt 1 ppm, der EKA-Wert $440 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in der Alveolarluft [142,144] bzw. 90 mg/l Blut für das N-Hydroxyethylvalin-Addukt [142,145].

1.4.4 Acrolein

Acrolein induziert oxidativen Stress, der mit einer Reihe chronischer Krankheiten in Zusammenhang gebracht wird. Allerdings werden direkt oder nach metabolischer Aktivierung keine oder nur schwache mutagene Eigenschaften beobachtet [67]. Von der International Agency for the Research on Cancer (IARC) wird Acrolein in die Klasse 3 (Nicht kanzerogen beim Menschen) eingestuft [146]. Eine ähnliche Bewertung liegt von der MAK-Kommission vor, die den Stoff in die Kategorie 3 einstuft (Verdacht auf Kanzerogenität, aber zu wenig relevante Daten) [142]. So finden Horton et al. [147] keine Induktion des *gadd153* (growth arrest on DNA damage gene) bei niedrigen Dosen Acrolein-Exposition in menschlichen Lungenzellen, was darauf hinweist, dass Acrolein nicht primär genotoxisch ist.

1.4.5 Ethylcarbamat

Ethylcarbamat ist ein potentes Kanzerogen, das in Mäusen, aber auch in anderen Spezies Lungentumoren sowie Tumore der Leber, der Haut und des hämatopoetischen Systems auslösen kann [7]. Nach Aktivierung durch CYP450 Enzyme ist es genotoxisch in verschiedenen *in vitro*-Systemen, darunter im Stamm *Salmonella typhimurium* TA100 und menschlichen, lymphoblastoiden TK6-Zellen, nicht jedoch in den Stämmen *Salmonella*

typhimurium TA98 und TA102. Eine genotoxische Wirkung ist auch auf *Sacchomyces cerevisiae* beobachtet worden, wobei in letzterem Falle keine metabolische Aktivierung nötig war [87]. Ethylcabamat wird von der MAK-Kommission in die Kategorie 2 (im Tierversuch krebserzeugender Stoff) eingeordnet [142].

1.5 Möglichkeiten des Biomonitorings für alkylierende Substanzen

Die Exposition des Menschen gegenüber alkylierenden Fremdstoffen in Umwelt, Nahrung, Genussmitteln, Gebrauchsgegenständen, Arzneistoffen usw. wird als externe Dosis oder äußere Belastung (Abb. 1.1) bezeichnet. Aus einer diffusen Exposition resultiert eine Hintergrundbelastung, die mit modernen Methoden des biologischen Monitorings erfasst werden kann. Von besonderem Interesse sind dabei solche Marker, die sich auf biochemische Primäreffekte zurückführen lassen (Hb-, DNA-Addukte), obwohl diese in der Regel keinen Krankheitswert besitzen. Diese Marker werden auch als Biomarker für die biologisch effektive Dosis bezeichnet. Die festgestellten Hintergrundbelastungen werden zwar primär durch die äußere Exposition bedingt, sie werden aber auch durch Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Fettanteil, Lebensgewohnheiten und genetische Prädisposition beeinflusst. Die sogenannte interne Dosis kann anhand spezifischer (z.B. Mercaptursäuren) oder unspezifischer (z.B. Thioether) Marker ermittelt werden. Beide stellen Endprodukte der GSH konjugierten Detoxifikation dar. In der Literatur sind zahlreiche Beispiele für Thioether-Bestimmungen beschrieben, meist für Arbeitsplatzexpositionen [148-154]. Hintergrundbelastungen wurden in zwei Studien erfasst [155,156], wobei Raucher signifikant höhere Ausscheidungsraten aufwiesen als Nichtraucher. Die Bestimmung der Thioether hat den generellen Nachteil, dass die Struktur der untersuchten Substanzen und damit die eindeutige Zuordnung zur Expositionsquelle unklar bleibt. Als Folge davon können analytische Kenndaten wie Ausbeute der Extraktion und die Effizienz der alkalischen Hydrolyse nicht exakt bestimmt werden [157]. Somit kann der Thioether-Assay nur eine Art Signalwirkung für eine erhöhte Belastung mit elektrophilen Verbindungen anzeigen. Die Bestimmung spezifischer Mercaptursäuren dagegen erlaubt zumindest in Fällen, in denen spektroskopische Detektoren eingesetzt werden, Aussagen über die Struktur der Entgiftungsprodukte. Im Falle einer analytischen Bestimmung mittels HPLC, mit UV-, Fluoreszenz- oder elektrochemischer Detektion ist eine Derivatisierung notwendig, um entweder chromophore Gruppen einzuführen oder die Löslichkeit bzw. Polarität zu verändern [158-167]. N-Acetyl-S-(2-

hydroxyethyl)-cystein wurde erstmals nach Derivatisierung mit o-Phthalaldehyd Mercaptoethanol (Bildung eines 1-Alkylthio-2-hydroxyethyl-indols, $\gamma_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\gamma_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$) nachgewiesen [168]. Gaschromatographie mit apolaren oder mittelpolaren Säulen ist eine nützliche Methode zur Abtrennung spezifischer Mercaptursäuren aus Urin mit den unterschiedlichsten Detektoren wie Stickstoff-Phosphor-selektiver Detektor (NPD), Flammenionisationsdetektor (FID) und massenspektrometrischer Detektion (MSD), jedoch ist in allen Fällen Derivatisierung notwendig [85,169-172]. In den letzten Jahren werden verstärkt HPLC-MS/MS-Kopplungen eingesetzt, die bei hoher Spezifität sehr sensitiv die Belastung mit elektrophilen Agenzien erfassen können [173-177]. Die toxikologische Beurteilung der Urinmetaboliten von Schadstoffen ist dadurch erschwert, dass es sich im allgemeinen um Entgiftungsprodukte handelt. Eine höhere Metabolitenkonzentration im Harn kann einerseits eine höhere Exposition andeuten, andererseits auf effektivere Entgiftungsmechanismen hinweisen.

Proteinaddukte – im speziellen die N-terminalen Valin-Addukte – werden als Biomarker im Arbeits- und Umweltschutz eingesetzt. Die Grundlage für das biochemische Effektmonitoring legten 1974 Ehrenberg und seine Mitarbeiter mit der Entwicklung des „Target-Dose-Konzept“, das eine lineare Korrelation zwischen Hb- und DNA-Addukten postuliert. Indem Potter et al. [178] dies für Ethylenoxid und Rios-Blanco et al. [179] für Propylenoxid nachgewiesen haben, lässt sich aus der Bestimmung von Hämoglobinaddukten das Risiko einer Exposition gegenüber der jeweiligen spezifischen kanzerogenen Substanz ermitteln [180]. Die Proteinaddukte sind ein Surrogatmarker und geben die biologisch wirksame Dosis in einem für die Messung zugänglichen Ersatzziel, vor allem Blut und Plasma an. Da zwischen Protein- und DNA-Bindung eine enge Korrelation besteht, ist das Ausweichen auf Hb-Addukte durchaus gerechtfertigt. Der Vorteil der Messung der Hb-Addukte ist die Erfassung eines Steady-state-Levels durch die lange Lebensdauer der Erythrozyten von 120 Tagen beim Menschen. Bedingt durch das Fehlen von Reparaturmechanismen akkumulieren die Addukte, so dass eine chronische Exposition messbar ist, allerdings können einmalige Expositionen nur bei hohen Dosen erfasst werden. Mit Hb-Addukten als Biomarkern ist eine Expositionskontrolle unter Berücksichtigung der individuellen Toxikokinetik möglich [81,116].

Meist wird zur Bestimmung der Hb-Addukte am N-terminalen Valin ein modifizierter Edman-Abbau mit anschließender gaschromatographischer Trennung und massenselektiver Detektion angewandt [81,82,181-203]. Diese Methode ermöglicht die selektive Abspaltung der Aminosäure Valin unter gleichzeitiger Derivatisierung zu entsprechenden

Pentafluorophenyl-thiohydantoinderivaten, die sehr gute Intensitäten sowohl mit Elektronenstoßionisation (EI) als auch mit Negativionen-chemischer Ionisation (NICI) ergeben (Abb. 3.1). In der Literatur sind darüber hinaus eine Reihe weiterer Methoden beschrieben, die es zum Teil ermöglichen, Addukte anderer Aminosäuren des Hämoglobins mit zu erfassen. Diese Methoden gehen meist von einer sauren oder alkalischen Hydrolyse des Hämoglobins oder Globins aus, wobei der eigentlichen Analyse in einigen Fällen eine Dialyse der Erythrozyten vorgeschaltet wird [204-217].

Die DNA stellt wohl das wichtigste Molekül der Zelle dar, da sie den „Bauplan“ der Zelle enthält und an alle Tochtergenerationen weitergibt. Die DNA kodiert für sämtliche Proteine, beispielweise Transkriptionsfaktoren und Enzyme, die für den Zellzyklus und Stoffwechselvorgänge benötigt werden. Eine Schädigung durch Adduktbildung ist besonders kritisch, da sie vermutlich den ersten Schritt, die Initiation, im Kanzerogeneseprozess darstellt [80,218-221]. Werden die gebildeten Addukte nicht oder falsch repariert, können sie Genmutationen verursachen, die bewirken, dass im Zuge eines mehrstufigen Prozesses eine entartete Zelle entsteht [221,222]. Wenn solche DNA-Addukte für eine Risikoabschätzung eingesetzt werden sollen, muss die Struktur der adduktbildenden Spezies, die Effizienz ihrer Reparatur sowie ihre biologische Relevanz bekannt sein. Allerdings bedeutet die Detektion von DNA-Addukten in bestimmten Geweben nicht notwendigerweise ein spezifisches tumorigenes Risiko, noch dazu, da die mutagenen Eigenschaften einzelner spezifischer Addukte um mehrere Größenordnungen differieren [223,224]. Die zellulären Antworten auf DNA-Modifikationen sind vielfältig und beinhalten Inhibierung der DNA-Synthese, Induzierung von DNA-Schäden, verantwortlichen Genen und DNA-Reparaturmechanismen wie De-Alkylierung, Basenaustausch, De-Purinierung oder De-Pyrimidierung.

Ein Humanmonitoring dieser biochemischen Effektmarker geht idealer Weise von Addukten in Zielgeweben aus. Da diese in der Regel nicht oder nur schwer zugänglich sind (im Rahmen einer Operation oder Nekroskopie), kann auf DNA aus Blutzellen (Lymphozyten) ausgewichen werden. Als nicht-invasive Methode steht die Bestimmung modifizierter Nukleinsäure-Basen in Urin zur Verfügung. Das Vorkommen solcher Moleküle in menschlichem Urin ist seit 1898 bekannt, als Krüger und Salomon 10000 l Urin fraktionierten und mehrere Gramm 7-Methylguanin isolierten [111]. Die Bestimmung solcher Moleküle in Urin stützt sich auf Tierversuche, in denen nach Gabe der Vorstufen [^{14}C]-Dimethylsulfat, [^{14}C]-NDMA oder seines Precursors [225,226] eine dosisabhängige Ausscheidung von [^{14}C]-7-Methylguanin beobachtet wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden mit Deuterium-markierten Verbindungen gemacht [226]. 3-Alkyladenine eignen sich als Biomarker insofern

besser als die reaktiveren Guaninaddukte, als die vorhandenen natürlichen Hintergrundbelastungen nicht so hoch sind wie bei 7-Methylguanin (ca. 10 mg/24 h Urin). Die Alkylierung an der N-3-Position des Adenins ist, abhängig von der Spezies, eine der Hauptrouten der DNA-Alkylierung für viele Kanzerogene [227]. Die resultierenden 3-Alkyldeoxyadenosine sind instabil (wobei die erhaltenen 3-Ethyladdukte stabiler sind als die 3-Methyladdukte [228]) und depurinieren entweder spontan oder durch spezifische DNA-Glykosylasen enzymatisch katalysiert [229] zu den korrespondierenden 3-Alkyladeninen, die im Urin ausgeschieden werden. Zwar ist auch eine Öffnung des Pyrimidinringes unter basischen Bedingungen beschrieben, aber dieser Prozess läuft wesentlich langsamer ab als die Depurinierung (Abb. 1.16). Die Halbwertszeit für diesen Prozess, nachgewiesen durch eine Reihe von *in vitro*-Untersuchungen, beträgt $t_{1/2} = 26$ h [111]. 3-Methyl-2-deoxyadenosin ($t_{1/2} = 35$ min) ist beispielsweise wesentlich instabiler als das DNA-Addukt ($t_{1/2} = 24$ h). Studien, in denen Probanden 3-MeAde und 3-EtAde verabreicht wurden, zeigen, dass 3-MeAde innerhalb von 24 h fast quantitativ (> 90 %) wieder ausgeschieden wird, während bei 3-EtAde eine entsprechende Rate von nur 67 – 74 % beobachtet wird [230].

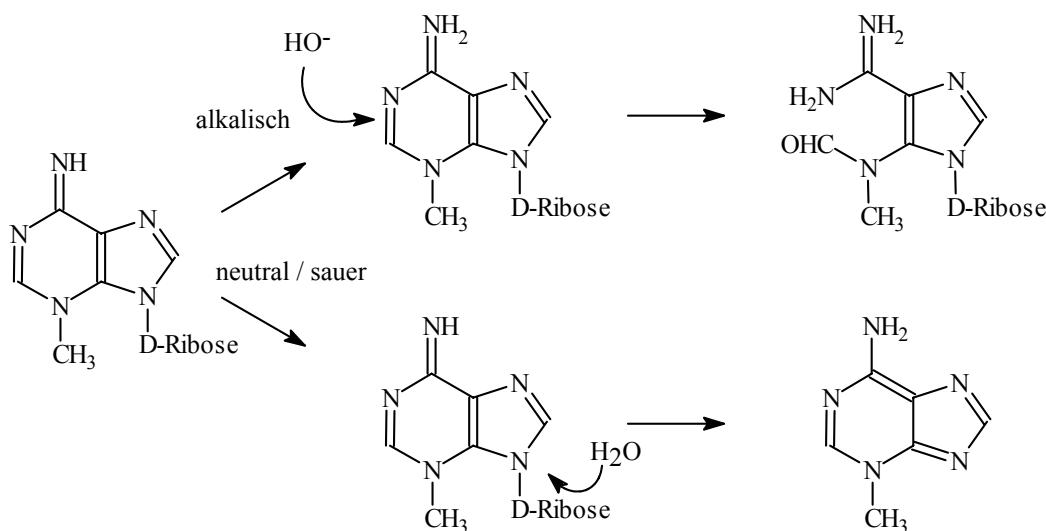


Abb. 1.16: Depurinierung und Ringöffnung von 3-(2-Desoxy)-methylenadenosin

In der Literatur wird vor allem eine Kombination aus Immunoaffinitäts-Chromatographie zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung gekoppelt mit kapillar-gaschromatographischer Trennung und massenselektiver Detektion (EI oder NICI) beschrieben. Während zu Beginn

der Analytik ein polyklonales Antiserum aus der Ratte, das an Protein A-Sepharose CL-4B als Trägermaterial gebunden war, gegen ein Strukturanaloges des 3-Methyladenins verwendet wurde [231], ist von Eberle et al. und Prevost et al. [230,232-235] eine Methode zur Simultanbestimmung verschiedener 3-Alkyladenine entwickelt worden, die einen monoklonalen Antikörper (EM-6-47) mit einem entsprechenden Trägermaterial koppeln. Mit diesem Trägermaterial bestückte chromatographische Säulen erlauben eine sehr selektive Anreicherung von 3-Methyladenin (3-MeAde), 3-Ethyladenin (3-EtAde), 3-(2-Hydroxyethyl)-adenin (3-HOEtAde) und 3-Benzyladenin (3-BzAde). Kleinere Studien, die mit diesen Methoden durchgeführt wurden, zeigen ein relativ hohes Grundlevel an 3-MeAde, das auf Einflüsse durch die Nahrung und eine endogene Bildung zurückzuführen ist. Es gibt Untersuchungen, wonach > 90 % des Adduktes in der Nahrung vorgebildet sein sollen [230]. Bei Verabreichen einer entsprechenden Diät lässt sich dieser Hintergrundwert entsprechend absenken [236]. 3-EtAde zeigt keinen oder nur geringen Einfluss der Ernährungsgewohnheiten [111,230]. Nachteil aller beschriebenen Methoden ist, dass ein Antikörper vorhanden sein muss. Der Umgang mit immunochemischen Methoden erfordert besondere Vorsichtsmassnahmen, was die Identität der gebundenen Analyten betrifft. Da die Säule mehrfach verwendet wird, muss sie regeneriert werden, was sich nur bis zu einer gewissen Sättigung ohne „Bluten“ unerwünschter Nebenkomponten oder der Analyten selbst realisieren lässt. In einem relativ aufwendigen Verfahren muss vor der eigentlichen Analyse die Kapazität der Säule bestimmt werden, außerdem nach jeder Regeneration erneut. Für den Einsatz im Routinebetrieb ist dieses Vorgehen nur bedingt einsatzfähig.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Methoden entwickelt und validiert werden, mit deren Hilfe ein möglichst umfassendes Humanbiomonitoring gegenüber alkylierenden Agenzien und damit Aussagen über eine akute, subchronische bis chronische Belastung mit diesen Stoffen oder ihren Vorläufern möglich sind. Eine bestehende Methode der DFG zum Nachweis von Alkyladdukten am N-terminalen Valin des Hämoglobins sollte so weiterentwickelt werden, dass neben dem Nachweis methylierender, hydroxyethylierender und cyanoethylierender auch eine Erfassung des Adduktes ethylierender Precursoren möglich ist. In einer neu zu entwickelnden Methode sollten die korrespondierenden alkylierten Mercaptursäuren in Humanurin bestimmt werden und in Zusammenhang mit der Thioether-Gesamtausscheidung gestellt werden. Wichtigstes Entwicklungskriterium war dabei eine robuste Methode, die durch Messung mit HPLC-APCI-MS/MS eine hohe Selektivität und Sensitivität gewährleistet, wobei ein hoher Probendurchsatz durch eine einfache Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion garantiert sein musste. Um die Exposition gegenüber alkylierenden Substanzen auch auf dem Level der DNA-Addukte abschätzen zu können, sollte eine Methode zur Bestimmung der DNA-Abbauprodukte 3-Methyl- und 3-Ethyladenin aus Humanurin entwickelt werden, die sich ebenfalls auf eine Festphasenextraktion stützt, gefolgt von einer Messung mit HPLC-APCI-MS/MS. Bisherige Methoden zur Erfassung dieser Addukte in einem Bereich, der bei nicht-exponierten Probanden bei wenigen ppb liegt, stützten sich immer auf den Einsatz eines mono- oder polyklonalen Antikörpers, wodurch die Praktikabilität bei großen Studien leidet und der Probendurchsatz verringert wird.

Mit den genannten Methoden sollte dann in einer Feldstudie die nicht beruflich bedingte Belastung mit alkylierenden Agenzien bei gesunden Probanden ermittelt werden. Zusätzlich sollten die gemessenen Werte mit weiteren Biomarkern korreliert werden. Mit Hilfe der so erhaltenen Daten sollte der Beitrag der Faktoren Nahrung, Rauchen und Passivrauchen zur Belastung mit alkylierenden Substanzen geklärt werden. Eine weitere Fragestellung befasste sich mit dem Einfluss genetischer Faktoren auf das individuelle Risiko. Zu diesem Zweck sollten die Messwerte mit dem Auftreten genetischer Polymorphismen korreliert werden, die die Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme beeinflussen können. Diese Polymorphismen sind im Rahmen einer anderen Dissertation an demselben Probandenkollektiv durchgeführt worden.

3 Materialien und experimentelle Methoden

3.1 Probandenstudie

3.1.1 Probanden

An der von März bis Oktober 1996 dauernden Studie im Analytisch-biologischen Forschungslabor (ABF) mit der Bezeichnung „PAH-Studie ‘96“ nahmen 69 Probanden (41 Männer und 28 Frauen) im Alter von 18 bis 70 Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung $35,4 \pm 10,5$) teil, die nach ihren eigenen Angaben in die Gruppen Raucher (N = 27), passivrauchbelastete (N = 19) und unbelastete Nichtraucher (N = 23) eingeteilt wurden. Als Passivraucher wurden Nichtraucher definiert, die mit mindestens einem Raucher in einem Haushalt zusammenlebten oder anderweitig häufig Tabakrauch ausgesetzt waren. Als Nichtraucher ohne ETS-Exposition galten Personen, die in Nichtraucherhaushalten lebten und nur sehr schwache anderweitige Passivrauchbelastung angaben. Ehemalige Raucher, die mindestens ein Jahr nicht geraucht hatten, galten als Nichtraucher. Alle Probanden waren Kaukasier, körperlich gesund und keinen bewussten Belastungen durch alkylierende Agenzien, beispielsweise am Arbeitsplatz oder durch medikamentöse Therapie, ausgesetzt.

3.1.2 Studiendesign

Während des unter 3.1.1 angegebenen Zeitraumes besuchten die Probanden sechsmal im Abstand von 4-8 Wochen das Labor. An jedem Termin lieferten die Teilnehmer einen 24-Stunden-Urin ab. Die Urinsammlung begann am Vortag des Abgabetermins unter Verwerfung des ersten Morgenurins. Die Sammelgefäße wurden während der Sammelphase bis zur Abgabe im Labor kühl gehalten (Kühlbox mit eingefrorenen Kühlelementen). Nach der Urinabgabe im Labor wurden pH-Wert und Volumen gemessen. Der Gesamtharn wurde in 250 ml Fläschchen portioniert und bei -30 °C gelagert. Zu Standardisierungszwecken und zur Kontrolle der Vollständigkeit der Sammlung wurde der Kreatiningehalt des Urins bestimmt [237,238]. Der Rauchstatus sowie das Ausmaß der ETS-Exposition wurde durch Messung von Cotinin im Urin [239] überprüft.

Den Probanden wurde in elf EDTA-Monovetten insgesamt je 99 ml Blut abgenommen. Daraus wurden Plasma, Erythrozyten und weiße Blutzellen gewonnen. Blutfraktionen, die für spätere Untersuchungen bestimmt waren, wurden portionsweise zu 5 ml bei -30 °C gelagert.

Zur weiteren unabhängigen Ermittlung der ETS-Exposition trugen alle Nicht- und Passivraucher eine Woche lang vor Abgabe der Blut- und Urinproben Luft-Passivsammler („Personal Sampler“), die auf Nikotin untersucht wurden [240]. Die Probanden führten auf Tagesbasis über 7 Tage ein Ernährungsprotokoll sowie Protokolle zum Zigarettenkonsum (Raucher) bzw. zur Passivrauchbelastung (Nichtraucher).

3.1.3 Protokoll- und Fragebögen

Die Protokolle waren tages- und stundenweise auszufüllen und enthielten exakte Mengenangaben bezüglich Speisen und Getränken, Zahl der gerauchten Zigaretten sowie Intensität der Passivrauchexposition. Die Protokollführung begann eine Woche vor jedem Abgabetermin. Der allgemeine Fragebogen enthielt neben persönlichen Angaben auch Fragen zu Freizeitaktivitäten und einer eventuell vorhandenen chronischen Erkrankung.

3.2 Laborgeräte und Chemikalien

3.2.1 Laborgeräte (alphabetisch)

Analysenwaage, 1601 A MP8-1, Sartorius, Göttingen

API 2000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, Applied Biosystems, Langen

Automatische Mikroliterpipetten, variabel einstellbar zwischen 1 und 10 µl, 10 und 100 µl, 100 und 1000 µl sowie zwischen 1000 und 5000 µl, Eppendorf, Hamburg

Bakerbond Festphasenextraktionsstation mit Einsatz und Trockenaufsatz, Mallinckrodt Baker, Griesheim

Bechergläser, 10....1000 ml, Schott, Mainz

Bördellkappen, Micro vial caps, 5180-0842, Agilent Technologies, Waldbronn

Braungläser – Kulturröhrchen 12 x 85 mm, GI 14 Gewinde, Kremer & Kreier Laborgeräte, München

Brutschrank Incu Shake, MMM Medcenter, Planegg

Büchi Rotationsverdampfer Rotavapor R-134, Büchi Labortechnik, Flawil, Schweiz

Büchi Wasserbad B-480, Büchi Labortechnik, Flawil, Schweiz

Coldlab, Maxicoldlab 2021, LKB, Malmö, Schweden

Combitips, 0,5 ml, 0030 048. 008, Eppendorf, Hamburg

Diazald-Glasapparatur, Aldrich, Steinheim

EDTA-Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht

Eindampf Röhrchen aus PP, 73.705, Sarstedt, Nümbrecht

Einmalreagenz- und Zentrifugenröhrchen, Kunststoff (14 ml), 55 463, Sarstedt, Nümbrecht

Einmalreagenz- und Zentrifugenröhrchen, Kunststoff (8,5 ml), 105 x 16 mm Ø, 55495, Sarstedt, Nümbrecht

Eismaschine, Ziegra, Bavaria, Ismaning

Gaschromatograph HP 5890 Serie II plus mit automatischem Probengeber 7673B und Split-/Splitless-Injektor, Massenselektiver Detektor HP 5972, Agilent Technologies, Waldbronn

Gaschromatograph Agilent Technologies GC 6890 plus mit automatischem Probengeber 7683 und Split-/Splitless Injektor, Ionisation Gauge Controller 59864 B, Massenselektiver Detektor AT 5973 N, Agilent Technologies, Waldbronn

GC-Säule ZB 5ms, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm Film, 7HG-G002-11, Phenomenex, Aschaffenburg

GC-Säule HP 5ms, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm Film, 19091S-105, Agilent Technologies, Waldbronn

GC-Säule HP 35ms, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm Film, 19091G-136, Agilent Technologies, Waldbronn

Gefrierschrank, Four seasons, Siemens, München

Graduierte Flaschen, 45 x 25 mm, 4 ml, Z.0401201 mit Schraubkappen mit Butyl/PTFE-Dichtung, Z.0491121, Zefa, Harthausen

HPLC-Säule Luna 3 µ C18(2), 75 x 4,6 mm, 00C-4251-E0, Phenomenex, Aschaffenburg

HPLC-Säule Luna 3 µ C8(2), 75 x 4,6 mm, 00C-4248-E0, Phenomenex, Aschaffenburg

HPLC-Säule Luna 3 µ C18(2), 75 x 4,6 mm, 00C-4251-E0, Phenomenex, Aschaffenburg

HPLC-Säule Synergi 4 µ Max RP 150 x 4,6 mm, 00F-4337-E0, Phenomenex, Aschaffenburg

HPLC-System von Bischoff, bestehend aus 2 x Bischoff HPLC 2250 Compact Pump, 738 Autosampler, UV-Detektor Lambda 1010, Bischoff Analysentechnik und –geräte, Leonberg

HPLC-System HP 1100, bestehend aus Degasser G 1322A, Binäre Pumpe G 1312A, Säulenofen G 1316A, UV-Detektor G 1314A, Autosampler G 1329A mit Thermostatisierungseinheit G 1330A, Agilent Technologies, Waldbronn

Ikamag RCT Magnetrührer, beheizbar, Ika-Werke, Stauffen

Isolute CN-Festphasenextraktionskartuschen, 200 mg, 3 ml, 420-0020-B, Separtis, Grenzach-Wyhlen

Isolute ENV+-Festphasenextraktionskartuschen, 50 mg, 1 ml, 915-0005-A, Separtis, Grenzach-Wyhlen

Isolute PTFE-Kanüle mit Absperrhahn für Festphasenextraktionsstation, 121-0001, Separtis, Grenzach-Wyhlen

Isolute Si-Festphasenextraktionskartuschen, 500 mg, 3 ml, 460-0050-B, Separtis, Grenzach-Wyhlen

IST Festphasenextraktionsstation VacMaster 20 mit Einsatz und Trockenaufsatz, 121-2016, Separtis, Grenzach-Wyhlen

Kompressor, Modell 4000, Jun Air, Norresundby, Dänemark

Kulturröhrchen, 20 x 150 mm, 60825 – 447, VLOR Scientific, West Chester, PA, USA

Laborflaschen mit Gewinde, braun, Duran, ISO 4796, 112180614, Zefa, Harthausen

Laborwaage, 1401 A MP8-1, Sartorius, Göttingen

Laborzentrifuge, Rotixa KS, Hettich, Tuttlingen

Laborzentrifuge, Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen

LV Evaporator, Zymark GmbH, Idstein / Taunus

Membranlufttrockner, 64-01, Whatman, Maidstone, UK

Messkolben (10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml), Schott, Mainz

Messkolben mit Schliff, 50 ml und 100 ml, NS 29/32, Duran, Schott, Mainz

Messzylinder (10 ml, 20 ml, 25 ml, 100 ml, 1000 ml), Schott, Mainz

Microvial, 100 µl, 5180-0844, Agilent Technologies, Waldbronn

Micro Well 96 F Mikrotiterplatten, 149026, Nunc, Wiesbaden

Millipore Filter-Anlage, Millipore, Bedford, USA

Millipore-Filter, Type FH 0,50 µm, FHUP04700, Millipore, Bedford, USA

Millipore-Filter, Type GS 0,22 µm White GSWP, GSWP04700, Millipore, Bedford, USA

Multikanal-Reader, Spectra II, SLT Labinstruments, Crailsheim

Multi-Tube-Vortexer, VWR, Miami, USA

NS-Stopfen mit Kegelschliff, DIN 12252, Form C, hohl aus Borosilikatglas, 134039129, NS 29/32, Kremer und Kreiler, München

Oasis MCX-Festphasenextraktionskartuschen, 150 mg, 6 ml, 186000256, Waters, Eschborn

Orbitalschüttler, Typ MPS.4, SLT Labinstruments, Grödig, Österreich

Parafilm Verschlussfolie, 284971606, Zefa, Harthausen

Pasteurpipetten, Glas, 225 mm, 5 ml, 7477 20, Brand, Wertheim

Pasteurpipetten, Glas, 150 mm, 2 ml, 7477 15, Brand, Wertheim

Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5000 µl, Eppendorf, Hamburg

Photometer Uvikon 810, Bio-Tek Instruments, Neufahrn
Präzisions Dispenser-Tips, PP/PE-HD, unsteril, 5 ml, 702374, Brand, Wertheim
Probengefäße, runder Boden, 2 ml, 0030 120.094, Eppendorf, Hamburg
Reacti-therm Probenkonzentrator mit Heizmodul und Trockenaufsatz, Pierce, Rockford, USA
Reagenzgläser, Kimax 51 disposable culture tubes, Borosilikatglas, 13 x 100 mm, 60825-571, VWR, Miami , USA
Reinstwasseranlage ABF, Seradest, München
Rollenmischer, Coulter Mixer, Coulter Electronics Limited, Hertfordshire, UK
Rollrand-Schnappdeckelgläser, 20 ml, 12 56 22 055, Kremer & Kreiler Laborgeräte, München
Schraubdeckelglas, Braunglas, 25 ml, 21 806 14, Schott, Mainz
Schraubverschluss-Kappen (rot) für Braungläser mit PTFE-beschichteten Dichtungen, 132924008. GI, Kremer & Kreiler Laborgeräte, München
Schraubverschluss-Kappen, aus PBT mit Silikondichtung mit PTFE-Folie, GL25, 112924013, Zefa, Harthausen
Software zur Auswertung: Easy Fit Version 4.11, SLT Labinstruments, Crailsheim
Speedvac Concentrator, Kremer und Kreiler Laborgeräte, München
Stickstoffgenerator, 75-72, Whatman, Maidstone, UK
Stopfen für Einmalreagenzröhrchen (14 ml), 65793, Sarstedt, Nümbrecht
Stopfen für Einmalreagenzröhrchen (8,5 ml), 65 803, Sarstedt, Nümbrecht
Thermostatisierbares Wasserbad, MGW, Lauda-Königshofen
Tischschüttelgerät, Heidolph REA 2000, Bender & Hobein, München
Tischschüttelgerät, IKA-Vibrax-VXA, Typ VX2, Janke & Kunkel, Staufen
Trockeneis, Granulat, Air Liquid, München
Ultraschallbad, Sonorex RK 100 H und Sonorex Super RK 1028, Bandelin Electronic, Berlin
Urinsammelfläschchen, 100....2000 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Vacuum Controler, KNF Neuberger, Freiburg
Vakuumexsikkator
Varipette, 10....100 µl, Eppendorf, Hamburg
Varipette, 100....1000 µl, Eppendorf, Hamburg
Varipette, 500....5000 µl, Eppendorf, Hamburg
Vials, Braunglas, 1,5 ml, mit Krimkappe, 1.300007, Ziemer, Mannheim
Vials, Micro 100 µl, 5180-0844, Agilent Technologies, Waldbronn
Vorsäule C8 3 mm, AJO-4290, Phenomenex, Aschaffenburg

Vorsäule C18 3 mm, AJO-4287, Phenomenex, Aschaffenburg

Vorsäule Max RP 3 mm, AJO-6074, Phenomenex, Aschaffenburg

Wasserbad, MGW, Lauda-Königshofen

Wasserbad, thermostatisierbar, Schultheiss, München

WTW pH 530 pH-Meter mit Einstabmesskette, Wissenschaftliche-Technische Werkstätten, Weilheim/Obb.

Zentrifugenglas mit Schliff, Duran, 112160114, Kremer und Kreiler, München

Zentrifugengläser mit Gewinde und Schraubkappe NS GL25, DIN 58970, 113380614, Zefa, Harthausen

Zentrifugengläser mit Gewinde und Schraubkappe, 100 x 11 mm, Duranglas, Pyrex, Zefa, Harthausen

Zentrifugengläser, Rundboden mit Schliff NS 19, DIN 58970, 113370614, Zefa, Harthausen

Zentrifugenröhrchen, 50 ml, aus PP, Nunc, Wiesbaden

3.2.2 Chemikalien und Gase (alphabetisch)

[D₅]-3-Ethyladenin (6-Amino-3-[D₅]-ethyl-purin), E897150, Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada

1-Methyladenin (6-Amino-1-methyl-purin), 99 %, 21,532-5, Aldrich, Steinheim

3-Ethyladenin (6-Amino-3-ethyl-purin), U1223, ChemSyn Science Lab., Lenexa, USA

3-Methyladenin (6-Amino-3-methyl-purin), 99 %, 28,087-9, Aldrich, Steinheim

3-p-Fluorphenyl-5-isopropyl-hydantoin, Q-1975, Bachem, Heidelberg

5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), ≈ 99 %, 43760, Fluka, Neu-Ulm

9-Ethyladenin (6-Amino-9-ethyl-purin), E-8006, Sigma, Deisenhofen

Acetonitril, für die HPLC, 1.00030.9010, Merck, Darmstadt

[D₃]-Acrylsäurenitril, 48,531,4, Aldrich, Steinheim

Ameisensäure, pro analysi, 98-100 %, 1.00264.1000, Merck, Darmstadt

Ammoniak 3.8, wasserfrei, 4930795, Linde, Unterschleißheim

Ammoniumacetat, pro analysi, 1.01116.1000, Merck, Darmstadt

Diazald, D2,800-0, Aldrich, Steinheim

Diethylether, nitrosaminfrei, für die Rückstandsanalyse, Code 9134, Promochem, Wesel

di-Natriumhydrogenphosphat, für die Molekularbiologie, 71636, Fluka, Neu-Ulm

Essigsäure, 96 %, Suprapur, 1.00055.0250, Merck, Darmstadt

Essigsäureethylester, für die Rückstandsanalytik, Code 1191.1, Promochem, Wesel
 Ethanol, nitrosaminfrei, Code 9812, Promochem, Wesel
 [D₅]-Ethyliodid, 32,458-2, Aldrich, Steinheim
 Formamid, Microselect für die Molekularbiologie, 47671, Fluka, Neu-Ulm
 Helium, 5.0, Linde, Unterschleißheim
 Humanhämoglobin, lyophilisiert, H7378, Sigma, Deisenhofen
 Kaliumchlorid, purum p.a., 60132, Fluka, Neu-Ulm
 Kaliumdihydrogenphosphat, pro analysi, 1.04873.1000, Merck, Darmstadt
 Kaliumhydroxid, pro analysi, 1.06498.1000, Merck, Darmstadt
 L(+)-Ascorbinsäure, pro analysi, 1.00127.0250, Merck, Darmstadt
 Methan, 5.5, Linde, Unterschleißheim
 Methanol, für die HPLC, Code 3041, Promochem, Wesel
 Methanol, nitrosaminfrei, Code 9835, Promochem, Wesel
 [D₃]-Methyliodid, 17,603-6, Aldrich, Steinheim
 Methyl-tert.-butyl-ether, für die Rückstandsanalytik, Code 9105, Promochem, Wesel
 N-(2-Cyanoethyl)-Val-Leu-Anilid, G-4285, Bachem, Heidelberg
 N-2-(Ethoxyethyl)-Val-Ala-Anilid, G-4445, Bachem, Heidelberg
 N-2-(Hydroxyethyl)-Val-Leu-Anilid, G-4295, Bachem, Heidelberg
 N-Acetyl-L-Cystein, > 99 %, A-8199, Sigma, Steinheim
 N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-cystein, Institut für Analytische Chemie der Universität Wien,
 Lehrstuhl Prof. Erich Schmid
 N-Acetyl-S-ethylcystein, Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Lehrstuhl
 Prof. Erich Schmid
 N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-cystein, Institut für Analytische Chemie der Universität Wien,
 Lehrstuhl Prof. Erich Schmid
 N-Acetyl-S-isopropylcystein, Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Lehrstuhl
 Prof. Erich Schmid
 N-Acetyl-S-methylcystein, Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Lehrstuhl
 Prof. Erich Schmid
 Natriumcarbonat, p.a., 106392, Merck, Darmstadt
 Natriumchlorid, puriss. p.a., 71380, Fluka, Neu-Ulm
 Natriumcitrat, 99,9 %, S4641, Sigma, Steinheim
 Natriumhydroxid, ≥ 99 % p.a., 6771.1, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
 Natriumhydroxid, p.a., 106498, Merck, Darmstadt

N-Ethyl-Val-Leu-Anilid, G-4325, Bachem, Heidelberg
n-Hexan, für die Rückstandsanalytik, Code 4159, Promochem, Wesel
N-Methyl-Val-Leu-Anilid, G-4275, Bachem, Heidelberg
ortho-Phosphorsäure, min. 85 % reinst, Art. 563, Merck, Darmstadt
Pentafluorophenylisothiocyanat, 76755, Fluka, Neu-Ulm
Pressluft, aus Kompressor, für die LC-MS/MS
Propanol-(2), für die Rückstandsanalytik, Code 1334, Promochem, Wesel
Salzsäure, $\geq 32\%$, 10 M, p.a., Art. P074.1, Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend, 37 %, $\rho = 1,19 \text{ g/cm}^3$, 1.00317.100, Merck, Darmstadt
Stickstoff, 5.0, Linde, Unterschleißheim
Stickstoff, aus Generator, für die LC-MS/MS
Toluol, Picograde, Code 1350, Promochem, Wesel
Trockeneis, Granulat, Air Liquide, München
Wasser, hochrein, 1.01262.1000, Merck, Darmstadt
Wasser, Reinstwasseranlage ABF, Seradest, München

3.3 Arbeitslösungen

0,002 M Ascorbinsäurelösung

In einem 500 ml Messkolben werden 0,176 g (0,001 Mol) Ascorbinsäure eingewogen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung wird bei +4 °C im Coldlab aufbewahrt und ist 3 Wochen verwendbar.

0,1 M Na₂CO₃-Lösung

In einem 200 ml Messkolben werden 2,12 g (0,02 Mol) Natriumcarbonat eingewogen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die so erhaltene Lösung wird bei +4 °C gelagert und ist zwei Tage lang verwendbar.

0,6 M Phosphatpuffer

In einem 1000 ml Messkolben werden 85,2 g (0,60 Mol) di-Natriumhydrogenphosphat eingewogen und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. In einem zweiten 1000 ml Messkolben werden 81,6 g (0,62 Mol) Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen und ebenfalls bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Von den hergestellten Lösungen werden 300 ml Kaliumdihydrogenphosphat- und 700 ml di-Natriumhydrogenphosphatlösung miteinander vermischt und durch tropfenweise Zugabe von di-Natriumhydrogenphosphatpuffer auf einen pH-Wert von $7,1 \pm 0,05$ eingestellt.

Der Puffer wird im Coldlab bei +4 °C gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt 3 Wochen.

0,9 %-ige Kochsalzlösung

In einem 1000 ml Messkolben werden 9,00 g (0,16 Mol) Natriumchlorid eingewogen. Anschließend wird der Kolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung wird bei +4 °C im Coldlab gelagert und ist 2 Monate verwendbar.

1 %-ige Essigsäure

In einem 1000 ml Messkolben werden etwa 500 ml Wasser vorgelegt, mit 10 ml Eisessig versetzt und mit Wasser auf 1000 ml verdünnt.

1 %-ige Lösung von Ethylacetat in Toluol

In einem 1000 ml Messkolben werden 10 ml Ethylacetat vorgelegt und mit Toluol bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und ist 3 Wochen verwendbar.

1 %-ige Natriumcitratlösung

In einem 500 ml Messkolben werden 5,00 g (0,03 Mol) Natriumcitrat eingewogen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung wird bei +4 °C im Coldlab gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt 3 Wochen.

1 M Salzsäure

In einen mit ca. 500 ml Wasser gefüllten 1000 ml Messkolben werden 82 ml Salzsäure pipettiert. Anschließend wird der Kolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung wird bei +4 °C im Coldlab aufbewahrt und ist über 6 Monate verwendbar.

10 mM Ammoniumacetatpuffer pH 6,8 für die HPLC

In einem 1000 ml Messkolben werden 770,8 mg (10,00 mMol) Ammoniumacetat eingewogen und der Kolben bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird über einen Millipore GS 0,22 µm Filter gereinigt.

Der Puffer wird bei +4 °C im Coldlab gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt 1 Woche.

2 % Ameisensäure in Methanol

In einem 500 ml Messkolben werden etwa 250 ml Methanol vorgelegt. Dazu pipettiert man 10 ml (0,27 Mol) Ameisensäure und füllt mit Methanol bis zur Marke auf.

Die Lösung wird bei +4 °C im Coldlab gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt 1 Woche.

20 mM Ameisensäure/Methanol 80:20 (V/V)

In einen mit ca. 500 ml Wasser gefüllten 1000 ml Messkolben werden 754 µl (20 mMol) Ameisensäure pipettiert. Anschließend wird der Kolben bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Zu 800 ml dieser Lösung gibt man 200 ml gefiltertes Methanol.

Die Lösung wird bei +4 °C im Coldlab gelagert und ist 1 Woche verwendbar.

4 N Salzsäure

In einem 100 ml Becherglas werden 56 ml Wasser vorgelegt und vorsichtig mit 40 ml konz. Salzsäure vermischt.

4 N Natronlauge

16,0 g (0,4 Mol) Natriumhydroxid-Plätzchen werden in 80 ml Wasser gelöst und bei Raumtemperatur auf 100 ml aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur in einer Polyethylenflasche aufbewahrt und ist 6 Monate verwendbar.

4 N Salzsäure in Phosphatpuffer

In einen 50 ml Messkolben werden 14 ml 0,6 M Phosphatpuffer pipettiert und vorsichtig mit 10 ml konz. Salzsäure vermischt.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und ist eine Woche verwendbar.

50 mMol/l Salzsäure in Isopropanol

In einem 1000 ml Messkolben werden 50 ml 1 M Salzsäure vorgelegt und mit Isopropanol bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung wird lichtgeschützt im Coldlab aufbewahrt und ist mind. 6 Monate verwendbar.

Diazomethan in Diethylether (ca. 16 mM)

Die Herstellung der etherischen Diazomethanlösung erfolgt gemäß der technischen Information Nr. AL-180 der Fa. Aldrich. Hierzu wird die Diazald-Glasapparatur gemäß

Abbildung 3 und 4 der Vorschrift unter einem gut ziehenden Abzug zusammengesetzt. In die Kühlfalle wird Trockeneisgranulat vorgelegt und langsam mit Aceton aufgefüllt. In den Reaktionskolben werden zu 5 g Kaliumhydroxid gelöst in 8 ml Wasser 10 ml Ethanol getropft. Der Auffangkolben wird mit einer Kochsalz-Eismischung (schichtweise 33 g Kochsalz in 100 g Eis) gekühlt. 5 g (23 mMol) Diazald werden in 45 ml Diethylether gelöst und mittels Tropftrichter langsam zur Reaktionslösung getropft, die vor und während der Zugabe im Wasserbad auf 65 °C temperiert wird. Nach vollständiger Zugabe der Diazald-Lösung werden nochmals 10 ml Diethylether zugetropft und die Destillation solange fortgesetzt, bis das Destillat farblos ist. Die etherische Diazomethanlösung wird bei –18 °C in 25 ml Braunglasschraubdeckelgläsern gelagert. Die Lösung ist über 2 Monate verwendbar. Diazomethanrückstände in der Apparatur werden durch vorsichtige Zugabe 1 %-iger Essigsäure zerstört.

DTNB (5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure))- Lösung

0,04 g (0,10 Mol) 5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) werden in einem 100 ml Messkolben eingewogen und bis zur Marke mit 1 %-iger Natriumcitratlösung aufgefüllt.

Die Lösung wird im Coldlab gelagert und ist lichtgeschützt 2 Tage verwendbar.

Ethylacetat (ammoniakgesättigt)

Eine mit 250 ml Ethylacetat gefüllte Waschflasche wird an zweiter Stelle in ein Begasungssystem integriert, welches aus vier Waschflaschen besteht. Die erste und dritte Flasche sind leer. Die vierte wird mit Wasser zu 2/3 gefüllt. Alle Flaschen werden durch Klammern gesichert. Die erste Flasche wird an das Druckventil einer Ammoniakflasche (3.8) angeschlossen. Das Ventil wird für 3 min. geöffnet.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und ist über zwei Tage verwendbar.

Ethylacetat (ammoniakgesättigt) mit 5 % Methanol

In einem 200 ml Messkolben werden 10 ml Methanol vorgelegt und mit ammoniakgesättigtem Ethylacetat bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird täglich frisch hergestellt.

Phosphat-Puffer (PBS) nach Vorschrift der Fa. Waters

In einem 250 ml Messkolben werden 0,05 g (0,67 mMol) Kaliumchlorid, 2,00 g (3,42 mMol) Natriumchlorid, 0,05 g (0,37 mMol) Kaliumdihydrogenphosphat und 0,288 g (2,03 mMol) di-

Natriumhydrogenphosphat eingewogen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt.

Die Lösung wird bei +4 °C im Coldlab gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt 3 Monate.

Verdünnte Salzsäure pH 2,5

Zu 200 ml Wasser wird unter ständiger pH-Kontrolle mit einem pH-Meter tropfenweise 1 M Salzsäure zupipettiert, bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert. Die Verwendbarkeit beträgt 1 Woche.

3.4 Analytik der Hämoglobinaddukte

3.4.1 Prinzip der Methode

Mit den hier angewandten Methoden können mittels GC-MS die Methyl-, Ethyl-, Hydroxyethyl- und Cyanoethyladdukte am N-terminalen Valin des Hämoglobins bestimmt werden. Die im Rahmen dieser Methoden beschriebene Präparation von Globin geht auf ein von Mowrer et al. entwickeltes Verfahren zurück [201]. Ehrenberg et al. [210] entwickelten eine Variante der Reaktion, die als „modifizierter Edman-Abbau“ bezeichnet wird und eine selektive Abspaltung alkylierter Valine nach folgendem Schema ermöglicht (Abb. 3.1)

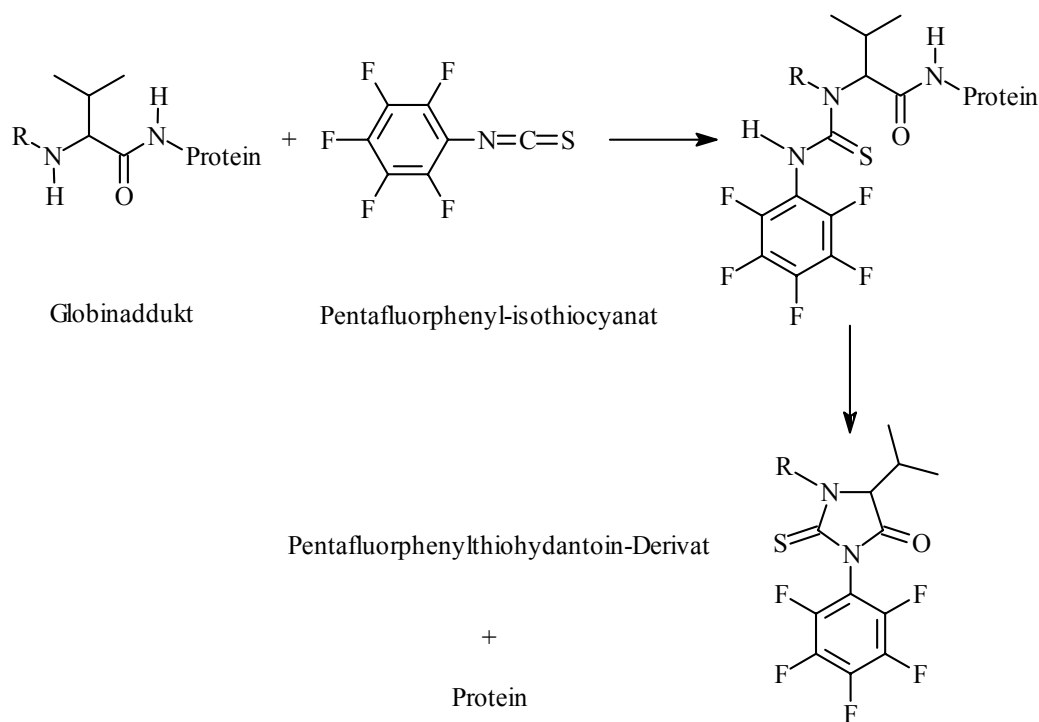


Abb. 3.1: Modifizierter Edman-Abbau

Globin wird aus dem zu untersuchenden Blut isoliert und mit Pentafluorophenylisothiocyanat umgesetzt. Dabei wird das am N-Terminus aller vier Aminosäureketten des Globins befindliche Valin, sofern es alkyliert ist, derivatisiert und unter Bildung des entsprechenden Pentafluorophenylthiohydantoin abgespalten [121]. Die entstehenden Derivate werden anschließend extrahiert, gewaschen und durch Festphasenextraktion weiter aufgereinigt. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit GC-MS-EI.

3.4.2 Synthese von Standardverbindungen

Alle Standards, Stamm- und Arbeitslösungen werden im Gefrierschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Verwendbarkeit der Standardlösungen beträgt 6 Monate.

N-[D₃]-Methylvalin-pentafluorophenylthiohydantoin ([D₃]-MeVal-PFPTH)

In einem 100 ml Rundkolben werden 1,00 g (15,5 μMol) Humanhämoglobin in 70 ml PBS gelöst und mit 1,0 g (6,9 mMol) [D₃]-Methyliodid versetzt, 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter ständigem Schütteln in einem Brutschrank inkubiert und entsprechend der Methode 3.4.5.3 gereinigt. 100 mg werden zur Darstellung eines deuterierten Multikomponentenstandards (IDS) in 1,5 ml Formamid gelöst (Lösung [D₃]-MeG). Weitere 100 mg werden entsprechend Methode 3.4.5.4.1 derivatisiert und aufgearbeitet. Statt die erhaltene Lösung in ein Microvial abzufüllen, wird sie 1:10000 mit Toluol verdünnt (Lösung A) und für die Herstellung des deuterierten Hydantoin-Standards verwendet (s.u.).

N-(2-[D₃]-Cyanoethyl)-valin-pentafluorophenylthiohydantoin ([D₃]-CyEtVal-PFPTH)

In einem 100 ml Rundkolben werden 2,00 g (31,0 μMol) Humanhämoglobin in 70 ml PBS gelöst und mit 1,00 g (17,8 mMol) [D₃]-Acrylnitril versetzt, 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter ständigem Schütteln in einem Brutschrank inkubiert und entsprechend der Methode 3.4.5.3 gereinigt. 100 mg werden zur Darstellung eines deuterierten Multikomponentenstandards (IDS) in 1,5 ml Formamid gelöst (Lösung [D₃]-CyEtG). Weitere 100 mg werden entsprechend Methode 3.4.5.4.1 derivatisiert und aufgearbeitet. Statt die erhaltene Lösung in ein Microvial abzufüllen, wird sie 1:20000 mit Toluol verdünnt (Lösung B) und für die Herstellung des deuterierten Hydantoin-Standards verwendet (s.u.).

N-[D₅]-Ethylvalin-pentafluorophenylthiohydantoin ([D₅]-EtVal-PFPTH)

In einem 100 ml Rundkolben werden 5,00 g (77,5 µMol) Hämoglobin in 70 ml PBS gelöst und mit 5,00 g (31,1 mMol) [D₅]-Ethyliodid versetzt, 24 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln in einem Brutschrank inkubiert und entsprechend der Methode 3.4.5.3 gereinigt. 100 mg werden zur Darstellung eines deuterierten Multikomponentenstandards (IDS) in 1,5 ml Formamid gelöst (Lösung [D₅]-EtG). Das erhaltene Globin wird mit nicht-exponiertem Globin, das nach Methode 3.4.5.3 aus Humanhämoglobin erhalten wurde, im Verhältnis 1:100 gemischt und nach Methode 3.4.5.4.1 derivatisiert und aufgearbeitet. Statt die erhaltene Lösung in ein Microvial abzufüllen, wird sie 1:1000 mit Toluol verdünnt (Lösung C) und für die Herstellung des deuterierten Hydantoin-Standards verwendet (s.u.).

3-p-Fluorphenyl-5-isopropyl-thiohydantoin-Lösung (FPIH)

In einem 50 ml Messkolben werden 10,0 mg (42,4 µMol) 3-p-Fluorphenyl-5-isopropyl-thiohydantoin eingewogen und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt. 100 µl dieser Lösung werden in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration beträgt dann 2 mg 3-p-Fluorphenyl-5-isopropyl-thiohydantoin pro Liter.

Interner, deuterierter Multikomponentenstandard (IDS)

10,0 g (155,0 µMol) Humanhämoglobin werden in 300 ml Phosphatpufferlösung (PBS) gelöst. Jeweils 5 ml der Lösung werden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und dann nach Methode 3.4.5.3 aufgearbeitet. 2,0 g (31,0 µMol) des so erhaltenen Globins werden in 30 ml Formamid gelöst (Globin-Stammlösung). Zu 10 ml dieser Stammlösung werden je 10 µl der Lösungen [D₃]-MeG und [D₃]-CyEtG, sowie 200 µl der Lösung [D₃]-EtG zupipettiert. Die Konzentration der drei deuterierten Spezies in der so erhaltenen Globinlösung ist so gewählt, dass bei Zugabe von 50 µl dieser Lösung zu 100 mg Humanglobin die im GC-MS detektierten Peakflächen der deuterierten Adduktspezies nach der Aufarbeitung nach Methode 3.4.5.4.1 eine vergleichbare Größenordnung aufweisen, wie die Peakflächen der physiologisch auftretenden, undeuterierten Adduktspezies. Die Lösung wird bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren und ist mindestens 2 Monate stabil.

Deuterierter Hydantoin-Standard (DHS)

Jeweils 2 ml der Standardlösungen A, B und C werden mit 2 ml FPIH-Lösung vermischt und in GC-Microvials zu je 100 µl portioniert. Die Lösungen werden bis zur Verwendung bei -20

°C eingefroren. Die Verwendbarkeit aller eingesetzten Standardlösungen liegt bei über 12 Monaten.

3.4.3 Kalibratoren

N-(2-Ethoxyethyl)-Val-Ala-Anilid (interner Standard, IS)

In einem 100 ml Messkolben werden 17,7 mg (52,7 µMol) N-2-Ethoxyethyl-Val-Ala-Anilid (entsprechend 10 mg N-(2-Ethoxyethyl)-Valin) eingewogen. Anschließend wird der Messkolben mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt. 200 µl dieser Lösung werden in einen 20 ml Messkolben pipettiert und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration beträgt dann 1 mg N-2-Ethoxyethyl-Valin pro Liter. Beide Lösungen sind bei –20 °C mindestens 30 Monate stabil.

N-Methyl-, N-Ethyl-, N-(2-Hydroxyethyl)-, N-(2-Cyanoethyl)-Val-Leu-Anilid

In jeweils einem 100 ml Messkolben werden 24,4 mg (76,4 µMol) N-Methyl-, 23,0 mg (69,0 µMol) N-Ethyl-, 21,6 mg (62,5 µMol) N-(2-Hydroxyethyl)- und 21,1 (58,9 µMol) mg N-(2-Cyanoethyl)-Val-Leu-Anilid eingewogen und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt. Die eingewogenen Mengen Anilid entsprechen jeweils 10 mg des Valin-Adduktes (N-Methyl-, N-Ethyl-, N-(2-Hydroxyethyl)-, N-(2-Cyanoethyl)-valin) in 100 ml Ethanol. Aus diesen Stammlösungen werden entsprechend des Pipettierschemas jeweils 3 Arbeitslösungen durch Verdünnen mit Ethanol hergestellt (Tab. 3.1). Die Arbeitslösungen sind bei –20 °C mindestens 30 Monate stabil.

Tab. 3.1: Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen AL I bis III

	<i>V Stammlösung</i> <i>[ml]</i>	<i>V Arbeitslösung</i> <i>[ml]</i>	<i>c Arbeitslösung</i> <i>[mg/l]</i>
AL I	10	100	10
AL II	1	100	1
AL III	0,1	100	0,1

3.4.4 Messgeräte und chromatographische Bedingungen

3.4.4.1 GC-MS/EI

Die analytische Bestimmung erfolgt mittels Massenspektrometrie gekoppelt mit gaschromatographischer Trennung. Die Messbedingungen sind in Tab. 3.2 wiedergegeben.

Tab. 3.2: GC-MS/EI-Bedingungen für die Bestimmung der N-terminalen Valin-Addukte

Injektion	Inlet A (splitless) Injektor: 240 °C, HP-Liner deaktiviert mit Glaswolle	
Säule	1: ZB 5ms, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm Film 2: ZB 50ms, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm Film	
Druckprogramm	Trärgas: Helium 5.0 Konstanter Trärgasfluss mit 80 kPa bei 80 °C	
Temperaturprogramm 1	80 °C, 1 min halten 15 °C/min auf 220 °C 5 °C/min auf 250 °C 25 °C/min auf 300 °C, 5 min halten Transfer Line: 280 °C	
Temperaturprogramm 2	50 °C, 1 min halten 10 °C/min auf 200 °C 5 °C/min auf 250 °C 25 °C/min auf 300 °C, 5 min halten Transfer Line: 280 °C	
Probenaufgabe	Splitless 1 µl Injektionsvolumen	
MS-Parameter	Ionisierungsart:	EI (Elektronenstoß)
	Ionisierungsenergie	70 eV
	Tune:	Max. Sensitivity Autotune
	Res. EM Voltage:	Multiplier-Spannung + 400 V
	Dwell-Time:	50 ms
	Solvent Delay:	10,5 min
	Resolution:	Low

Detektion	Selected Ion Monitoring Mode (SIM) Gruppe 1: 12 – 13,2 min; m/z 341, 338, 357, 352 Gruppe 2: 13,2 – 14,25 min; m/z 194, 236 Gruppe 3: 14,25 – 15,5 min; m/z 367, 396 Gruppe 4: 15,5 – 18 min; m/z 338, 335, 377
-----------	---

3.4.4.2 GC-MS/NICI (EC)

Die analytische Bestimmung erfolgte mittels Massenspektrometrie mit Negativionen-chemischer Ionisation gekoppelt mit gaschromatographischer Trennung. Die Messbedingungen sind in Tab. 3.3 wiedergegeben.

Tab. 3.3: GC-MS/NICI(EC) Bedingungen für die Bestimmung der N-terminalen Valin-Addukte

Injektion	Inlet B (splitless) Injektor: 240 °C, HP-Liner deaktiviert mit Glaswolle
Säule	HP 5ms, 25 m x 0,2 mm ID x 0,33 µm Film
Druckprogramm	Trärgas: Helium, 5.0
	Konstanter Trägergasfluss mit 120 kPa bei 80 °C
Temperaturprogramm	80 °C, 1 min halten 15 °C/min auf 220 °C 5 °C/min auf 250 °C 25 °C/min auf 300 °C, 5 min halten Transfer Line: 300 °C
Probenaufgabe	Splitless 1 µl Injektionsvolumen

MS-Parameter	Ionisierungsart:	NICI (Electron Capture)
	Moderatorgas:	Methan 5.5
	Tune:	NCI CH ₄ Autotune
	Res. EM Voltage:	Multiplier-Spannung + 400 V
	Dwell-Time:	50 ms
	Solvent Delay:	8 min
	Resolution:	Low
	MS-Quadrupol:	106 °C
	MS-Source:	150 °C
Detektion	Selected Ion Monitoring Mode (SIM) Gruppe 1: 8,0 – 9,2 min; m/z 341, 238, 338, 318 Gruppe 2: 9,2 – 10,4 min; m/z 356, 351, 336, 331 Gruppe 3: 10,4 – 12,4 min; m/z 358, 348, 277, 274 Gruppe 4: 12,4 – 14,5 min; m/z 395, 246	

3.4.5 Bestimmung der Hämoglobinaddukte

3.4.5.1 Probenlagerung

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben stammen aus der unter 3.1.1 beschriebenen Studie. Plasma und Erythrozyten wurden durch Zentrifugation (500 g, 10 min, 10 °C) getrennt. Die Erythrozyten wurden zweimal mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung gewaschen und bis zur weiteren Untersuchung bei –20 °C eingefroren.

3.4.5.2 Gewinnung des Erythrozytenhämolysats

Mit Hilfe einer EDTA-Monovette werden dem Probanden 5 ml venöses Vollblut abgenommen. Die Blutprobe wird auf einem Rollenmischer gründlich durchmischt und anschließend zentrifugiert (10 min, 10 °C, 800 g), um die Erythrozyten vom Blutplasma abzutrennen. Der Plasmaüberstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen oder für andere Analysen verwendet. Die Erythrozytenfraktion wird mit 5 ml Kochsalzlösung (0,9 %-ig) versetzt, mehrmals vorsichtig umgeschwenkt und erneut unter den angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig mit einer

Pasteurpipette abgehoben und verworfen. Dieser Waschvorgang wird wiederholt, bis der Überstand klar und farblos ist. Die gewaschene Erythrozytenfraktion (ca. 2,5 ml) wird zur Hämolyse mit dem gleichen Volumen hochreinen Wassers versetzt und bis zur Isolierung des Globins mindestens 60 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Bei älteren, zum Teil bereits hämolysierten Erythrozyten fallen die Waschschrte mit Kochsalzlösung weg. Die Proben werden direkt mit einer äquivalenten Menge hochreinen Wassers versetzt und ebenfalls mindestens 60 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Isolierung des Globins (Abschnitt 3.4.5.3) erfolgt dann wie bei frischen Blutproben.

3.4.5.3 Isolierung des Globins

Etwa 5 ml Erythrozytenhämolysat werden bei Raumtemperatur aufgetaut und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 25 ml 50 mMol/l Salzsäure in Isopropanol-Gemisch wird die Probe auf einem Multi-Tube-Vortexer geschüttelt (10 min). Die ausgefallenen Zellbestandteile werden abzentrifugiert (10 min, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2000 g), der Überstand in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und vorsichtig mit 20 ml Ethylacetat versetzt. Um eine vollständige Fällung des Globins zu erreichen, muss man die Probe mindestens 1 h im Kühlschrank stehen lassen und erst dann mit dem Multi-Tube-Vortexer kräftig schütteln (2 min.). Nach Zentrifugation der Probe (5 min, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1500 g) wird der Überstand vom ausgefallenen Globin abdekantiert und verworfen. Anschließend wird das Globin viermal mit Ethylacetat gewaschen, indem man das Globin in jeweils 15 ml Ethylacetat durch kräftiges Schütteln resuspendiert und die Probe erneut bei den angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Abschließend wird das Globin mit 5 ml n-Hexan gewaschen, die Suspension zentrifugiert (5 min, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1500 g) und der Überstand erneut verworfen. Das gereinigte Globin wird bei Raumtemperatur in einem Vakuumexsikkator getrocknet (24 h, 220 mbar). Die Lagerung erfolgt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.5.4 Derivatisierung und Aufarbeitung des Globins

3.4.5.4.1 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Addukte mittels Festphasenextraktion

Aus etwa 40 ml Formamid werden in ca. 30 min Ammoniak und flüchtige Amine im Stickstoffstrom ausgetrieben, bis ein angefeuchtetes Lackmuspapier im Dampfraum keine

flüchtigen, alkalisch reagierenden Verbindungen mehr anzeigt. Der pH-Wert sollte bei 7,0 bis 7,5 liegen. 100 mg (1,55 μ Mol) Globin werden in ein Zentrifugenglas mit Schliff oder Gewinde eingewogen und mit 1,5 ml des gereinigten Formamids versetzt. Die Probe wird anschließend mit Hilfe eines Multi-Tube-Vortexers (20 min) geschüttelt. Sollte sich das Globin dabei nicht vollständig lösen, wird die Probe ins Ultraschallbad gestellt (10 min). Zu der dann klaren, dunkelbraun gefärbten Lösung gibt man 100 μ l des internen Standards (IS) [1 mg/l], 50 μ l des deuterierten Standards (IDS) sowie 22,5 μ l 4 M Natronlauge und kontrolliert den pH-Wert. Dieser muss in einem pH-Bereich zwischen 7,0 und 7,5 liegen. Die Derivatisierung erfolgt mit 22,5 μ l Pentafluorphenylisothiocyanat nach Vermischung der Reaktionspartner mit dem Multi-Tube-Vortexer (2 min) über 3 h bei 80 °C im Wasserbad. Man lässt die Probe bei Raumtemperatur abkühlen, sättigt mit Natriumchlorid und extrahiert mit 4 ml Methyl-tert.-butylether. Die Probe wird dazu intensiv auf einem Multi-Tube-Vortexer geschüttelt (5 min), wobei auf eine vollständige Durchmischung zu achten ist, anschließend zentrifugiert (5 min, 10 °C, 2200 g) und die Etherphase mit einer Pasteurpipette vorsichtig in ein Pyrexgläschen überführt. Die Extraktion wird nochmals mit 4 ml und einmal mit 2 ml Methyl-tert.-butylether wiederholt. Die vereinigten Etherphasen werden in einem Reacti-therm unter Stickstoff bei 45 °C eingengt, bis nur noch ein klarer, etherfreier Rückstand (ca. 100 μ l) bleibt. Der Rückstand wird in 1 ml Toluol aufgenommen, mit 2 ml hochreinem Wasser versetzt, kräftig mit einem Multi-Tube-Vortexer geschüttelt (2 min) und zentrifugiert (2 min, 10 °C, 2200 g). Die wässrige Unterphase wird mit einer Pasteurpipette möglichst toluolfrei angesaugt und verworfen. Der Waschvorgang wird anschließend mit 2 ml 0,1 M Natriumcarbonatlösung wiederholt. Nach der Zentrifugation wird die Toluolphase mit einer Eppendorf-Pipette wasserfrei und möglichst vollständig abgehoben und mittels Festphasenextraktion (SPE) aufgereinigt. Dazu werden zunächst eine Isolute-CN- und eine Isolute-SI-Festphasenextraktionskartusche getrennt voneinander mit Toluol konditioniert. Auf die Cyanopropylkartusche werden dazu dreimal je 3 ml Toluol aufgetragen, wobei darauf zu achten ist, dass die Kartusche nicht trockenläuft. Die Silikakartusche wird solange mit Toluol konditioniert, bis das Packungsmaterial homogen benetzt ist. Dann werden beide Kartuschen mittels eines Adapters in der Weise gekoppelt, dass die gewaschene Toluolphase auf die Cyanopropylkartusche aufgetragen und erst dann die Silikakartusche durchlaufen wird. Die Kartuschen werden nach der vollständigen Probenaufgabe trockengesaugt (1 min, 900 mbar). Anschließend werden die Analyten mit 8 ml einer Lösung von 1 % Ethylacetat in Toluol in ein Kulturröhrchen eluiert. Zur vollständigen Elution werden nach dem Durchlaufen des Eluats die Kartuschen trockengesaugt (2 min, 750 mbar). Der Extrakt wird im LV Evaporator

bei 65 °C Wasserbadtemperatur bis zur Trockene eingengt. Der Vordruck am Gerät wird dabei zunächst für 10 min auf 2 Psi, dann für 30 min. auf 4 Psi und für die restliche Zeit auf 5 Psi eingestellt. Die Proben sind in etwa 60 – 70 min eingengt. Der Rückstand wird in 1 ml Toluol aufgenommen, wobei die Pipette am oberen Rand des Kulturröhrchens rundherum entlang geführt werden sollte, um eventuell an der Glaswand haftende Probenrückstände in Lösung zu bringen. Der Rückstand wird durch Schütteln mit dem Multi-Tube-Vortexer (5 min) vollständig in Lösung gebracht und in ein Eindampfröhrchen überführt. Nach erneutem Einengen bis zur Trockene im Reacti-therm bei 50 °C wird der Rückstand in 50 µl Toluol aufgenommen, durch Schütteln mit einem Tischschüttelgerät (10 s) vollständig in Lösung gebracht und in ein Microvial überführt. Die Probe wird bis zur Analyse bei –20 °C gelagert und ist mindestens 2 Wochen stabil.

3.4.5.4.2 Etablierung einer Methode zur Bestimmung der Addukte ohne Festphasen-extraktion

Die Derivatisierung, Extraktion mit Methyl-tert.-butylether und das Waschen mit Wasser und Natriumcarbonatlösung erfolgt wie unter Methode (3.4.5.4.1) beschrieben. Nach der Zentrifugation wird die Toluolphase allerdings nicht auf eine SPE-Kartusche aufgetragen, sondern direkt in ein Eindampfröhrchen überführt und in einem Reacti-therm bei 50 °C unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Dann wird der Rückstand in 50 µl Toluol aufgenommen, durch Schütteln mit einem Tischschüttelgerät (10 s) vollständig in Lösung gebracht und in ein Microvial überführt. Die Probe wird bis zur Analyse bei –20 °C gelagert und ist dort längere Zeit stabil.

3.4.6 Identifizierung der Analyten

Die Identifizierung der gemessenen Substanzen erfolgt entsprechend ihrer Retentionszeiten und ihrer Ionenspuren (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Identifizierung der Substanzen (GC-MS/EI)

<i>Substanz</i>	<i>RT</i> <i>[min]</i>	<i>Gemessene Ionenspuren</i> <i>(m/z)</i>	<i>Ausgewertete Ionenspur</i> <i>(m/z)</i>
N-[D ₃]-Methyl-Valin-PFPTH	10,44	341	341
N-Methyl-Valin-PFPTH	10,45	338	338
N-[D ₅]-Ethyl-Valin-PFPTH	10,29	357	357
N-Ethyl-Valin-PFPTH	10,30	352	352
N-(2-Ethoxyethyl)-Valin-PFPTH	11,62	367, 396	396
N-(2-Hydroxyethyl)-Valin-PFPTH	12,87	308, 350	308
N-(2-[D ₃]-Cyanoethyl)-Valin-PFPTH	13,81	338	338
N-(2-Cyanoethyl)-Valin-PFPTH	13,84	335, 377	335

3.4.7 Kalibrierung

Für die Erstellung der jeweiligen Kalibriergeraden wird ein Globinpool mit möglichst geringer Adduktkonzentration hergestellt. Dazu wird ein Pool aus dem Globin mehrerer Nicht- und Passivraucher angelegt. Es werden in einem Doppelansatz je 8 x 100 mg Globin (S0 bis S7) eingewogen und entsprechend dem Pipettierschema (Tab. 3.5) mit den Arbeitslösungen AL II und AL III (siehe Abschnitt 3.4.2) aller zu untersuchenden Addukte dotiert.

Sollen höhere Adduktkonzentrationen gemessen werden, kann auch mit den höheren Konzentrationen aus AL 1 dotiert werden. Alle dotierten Proben werden entsprechend der Methode (3.4.5.4.1 bzw. 3.4.5.4.2) aufgearbeitet.

Tab. 3.5: Schema zur Dotierung der Globin-Poolproben zur Kalibrierung

<i>Standard</i>	<i>μl AL II</i> <i>[1 mg/l]</i>	<i>μl AL III</i> <i>[0,1 mg/l]</i>	<i>Adduktkonzentration</i> <i>[ng/100 mg Globin]</i>	<i>Adduktkonzentration</i> <i>[μg/l Blut]</i>
S0	-	-	-	-
S1	-	10	1	1,57
S2	-	20	2	3,14
S3	-	30	3	4,71
S4	-	50	5	7,85
S5	-	100	10	15,7
S6	25	-	25	39,25
S7	50	-	50	78,5

Die Messwerte des Doppelansatzes werden gemittelt, die Kalibriergeraden erhält man durch lineare Regression, wobei die Konzentration die unabhängige und QR (der Quotient aus der Peakfläche des zu bestimmenden N-substituierten Valins und der Peakfläche des zugehörigen deuterierten internen Standards bzw. im Falle von HyEtVal-PFPTH des EtOEtVal-PFPTH-Standards) die abhängige Variable ist.

Da das für die Erstellung der Kalibrierlösungen verwendete Globin eine unbekannte Menge an addukttragendem Valin enthält, ist es unvermeidbar, dass die Messwerte um einen zwar konstanten und geringen, aber dennoch unbekannten Betrag erhöht sind. Deshalb wird der Quotient QR der undotierten S0-Lösung, der den reinen Adduktspiegel des Globinpools wiedergibt, von allen erhaltenen Quotienten QR abgezogen.

3.4.8 Berechnung der Ergebnisse

Zur Berechnung der Konzentration an N-substituierten Valinen werden für jede Probe die Quotienten aus den Peakflächen der zu bestimmenden N-substituierten Valine (MeVal, EtVal, CyEtVal bzw. HyEtVal) und den Peakflächen des jeweiligen deuterierten internen Standards gebildet. Da die Wiederfindungsraten für den Analyten und den jeweiligen deuterierten Standard praktisch identisch sind und zu jeder Probe eine konstante Konzentration an deuteriertem Standard zugegeben wurde, kann der Quotient QR aus beiden Peakflächen direkt

in die entsprechende Kalibriergerade eingesetzt werden. Für HyEtVal wird hinsichtlich des internen Standards (IS) ebenfalls die Annahme getroffen, dass eine gute Übereinstimmung der Wiederfindungsraten von Analyt und Standard vorliegt. Man erhält die Konzentration in ng/ml Probe.

3.4.9 Validierung der Methoden

3.4.9.1 Methode mit Festphasenextraktion

Die Präzision der Methode wird anhand eines Nichtraucher-/Passivraucherpools sowie eines Raucherpools überprüft, die zur Bestimmung der Wiederholbarkeit und der Genauigkeit der Methode eingesetzt werden. Dazu werden aus dem Nichtraucher-/Passivraucherpool an 7 Tagen insgesamt 12 Poolproben, aus dem Raucherpool an 8 Tagen insgesamt 13 Proben aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.1 angegeben. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode werden nach zwei verschiedenen Verfahren ermittelt. Eine Möglichkeit der Bestimmung basiert auf der Multiplikation des Achsenabschnitts der jeweiligen Kalibriergeraden mit dem Faktor 3,3 (Nachweisgrenze (NWG), engl. limit of detection, (LOD)) bzw. 10 (Bestimmungsgrenze (BSG), engl. limit of quantitation, (LOQ)). Die zweite Möglichkeit beruht auf der Integration der kleinsten detektierbaren Peakfläche, die ebenfalls mit dem Faktor 3,3 (LOD) bzw. 10 (LOQ) multipliziert wird. In beiden Fällen wird der erhaltene Wert für QR in die Kalibriergerade eingesetzt und daraus der Grenzwert abgelesen. Eine Übersicht über die so erhaltenen Werte gibt Tab. 4.7. Die Linearität der Methode wird aus den mit Microsoft Excel berechneten Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten abgelesen (Tab. 4.9). Für die Bestimmung der Selektivität der Methode dient in erster Linie die Aufnahme von GC-MS-Fullscan-Massenspektren der PFPTH-Derivate von Standardlösungen der Analyten. Um zusätzlich die Spezifität überprüfen zu können, werden die Spektren sowohl mit Elektronenstoßionisation (EI) als auch mit Negativionen-chemischer Ionisation (NICI) aufgenommen. Die erhaltenen chromatographischen Retentionszeiten, Peakform und Peakweiten vereinfachen die Identifizierung der Analyten in Realproben. Werden mehrere Ionenspuren pro Analyt gemessen, kann das Verhältnis der Ionenintensitäten zueinander zur Identifizierung herangezogen werden. Die deuterierten Standards tragen zur Bestimmung der Selektivität insofern mit bei, als ihre Retentionszeiten auf Grund der geringeren Polarität nur wenige

Sekunden kürzer sind und sie mit den Analyten quasi ko-eluierten. Während der Messung der Studienproben werden die Mittelwerte und Variationskoeffizienten (VK's) der Retentionszeiten des deuterierten Hydantoin-Standards gebildet. Die VK's sollen kleiner 5 % sein. Als Maß für die Messgenauigkeit wird für jeden Analyten eine Kontrollkarte geführt. Als Beispiel sind zwei Kontrollkarten im Anhang 8.2 (Abb. 8.1 und 8.2) gezeigt.

3.4.9.2 Methode ohne Festphasenextraktion

Die Präzision der Methode wurde anhand eines Globinpools (ein Raucher, ein Nichtraucher) überprüft, der zur Bestimmung der Wiederholbarkeit und der Genauigkeit der Methode entsprechend Tab. 4.2 aufgearbeitet wurde. Für die Bestimmung der relativen Wiederfindungsrate werden Poolproben (Globinmischung aus 3 Nichtraucherproben) zur Bestimmung des Grundlevels mehrmals vermessen. Die Dotierexperimente und die Ergebnisse sind in Tab. 4.3 – 4.6 angegeben. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, Linearität und Selektivität werden analog 3.4.9.1 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.8 – 4.9 angegeben. Die Massenspektren sind in den Abbildungen 4.1 – 4.14 gezeigt. Während der Messung der Studienproben werden die Mittelwerte und Variationskoeffizienten (VK's) der Retentionszeiten gebildet. Die VK's sollen kleiner 10 % sein. Die Robustheit der Methode wird in einem Laborvergleich (Fa. Bayer AG, Werk Leverkusen, Abt. Werksärztlicher Dienst) getestet. Dazu werden je 6 Proben ausgetauscht, die ohne Kühlung verschickt und bis zur Messung bei –20 °C gelagert werden. Im ABF werden die Proben von zwei Mitarbeitern untersucht. Der einzelne Mitarbeiter bearbeitet jede Probe einmal. Die so ermittelten Ergebnisse sind daher ein Maß für die intra- und inter-Laborpräzision. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.10 dargestellt.

3.5 Analytik der Mercaptursäuren

3.5.1 Prinzip der Methode

Zum Nachweis der Mercaptursäuren wird der Urin nach pH-Einstellung auf pH 2,5 und Zusatz von N-Acetyl-S-isopropylcystein (iPrMA) als internem Standard (IS) über eine einfache Festphasenextraktion an Polymermaterial von Probenmatrix weitgehend befreit und die Analyten abgetrennt. Nach Elution wird mit HPLC-Laufmittel aufgenommen und die

Proben mit HPLC-MS/MS durch Messung jeweils eines spezifischen Ionenüberganges quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgt durch Dotierung eines Poolurins mit einer Multikomponenten-Standardlösung, der analog zu den Urinproben aufgearbeitet wird. Der einfache Methodenaufbau ermöglicht einen relativ hohen Probendurchsatz.

3.5.2 Standardlösungen

Die Standards N-Acetyl-S-methylcystein (MMA), N-Acetyl-S-ethylcystein (EMA), N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-cystein (CEMA) und N-Acetyl-S-isopropylcystein (iPrMA) wurden von Prof. E. Schmid, Institut für Analytische Chemie, Universität Wien, als Feststoffe zur Verfügung gestellt. N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-cystein (HPMA) und N-Acetyl-S-(2-hydroxyethyl)-cystein (HEMA) standen als Lösungen unbekannter Konzentration zur Verfügung. Alle Standards, Stamm- und Arbeitslösungen werden im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Die Verwendbarkeit der Standardlösungen beträgt 6 Monate.

N-Acetyl-S-isopropylcystein (interner Standard, IS)

In einem 20 ml Messkolben werden 20,0 mg (9,74 mMol) N-Acetyl-S-isopropylcystein eingewogen. Anschließend wird der Messkolben mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung wird in einen 20 ml Messkolben pipettiert und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration der Arbeitslösung I beträgt 50 mg N-Acetyl-S-isopropylcystein pro Liter.

N-Acetyl-S-methylcystein

In einem 10 ml Messkolben werden 10,0 mg (5,64 mMol) N-Acetyl-S-methylcystein eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

N-Acetyl-S-ethylcystein

In einem 10 ml Messkolben werden 10,0 mg (5,22 mMol) N-Acetyl-S-ethylcystein eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-cystein

In einem 10 ml Messkolben werden 5,00 mg (2,31 mMol) N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-cystein eingewogen und der Messkolben mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-cystein

Ein Milliliter der Standardlösung in Acetonitril unbekannter Konzentration wird in einem Eppendorf-Cap an der Speedvac bei 300 mbar zur Trockene eingengt, das Eppendorf-Cap bis zur Gewichtskonstanz ausgewogen und der Rückstand in Methanol umgelöst. Dieses Vorgehen wird dreimal wiederholt. Die so bestimmte Konzentration beträgt 1,33 g/l. 1 ml dieser Lösung wird in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration der Stammlösung beträgt 133 mg/l.

3.5.3 Kalibratoren

Aus den Standardlösungen (3.5.1) wird eine 4-Komponenten-Standardlösung (4-Mix) erstellt, der die Mercaptursäuren MMA, EMA HPMA und CEMA in den jeweiligen Konzentrationen 250 mg/l, 250 mg/l, 33,25 mg/l und 125 mg/l enthält. Aus diesem 4-Mix werden 3 Arbeitslösungen zur Kalibrierung hergestellt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 3.6 gezeigt.

Tab. 3.6: Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen AL I bis III

	<i>V 4-Mix Stammlösung</i>	<i>V Arbeitslösung</i>	<i>c Arbeitslösung</i>			
	<i>[ml]</i>	<i>[ml]</i>	<i>[µg/l]</i>			
			MMA	EMA	HPMA	CEMA
AL I	10	100	25000	25000	3325	12500
AL II	1	100	2500	2500	333	1250
AL III	0,1	100	250	250	33,25	125

N-Acetyl-S-(2-hydroxyethyl)-cystein

Ein Milliliter der Standardlösung in Acetonitril unbekannter Konzentration wird in einem Eppendorf-Cap an der Speedvac bei 300 mbar zur Trockene eingengt, das Eppendorf-Cap bis zur Gewichtskonstanz ausgewogen und der Rückstand in Methanol umgelöst. Diese Vorgehen wird in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt. Die so bestimmte Konzentration beträgt 1,36 g/l. 100 µl dieser Lösung werden in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration der Stammlösung beträgt dann 13,6 mg/l. Aus dieser Stammlösung werden 2 Arbeitslösungen zur Kalibrierung hergestellt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 3.7 gezeigt.

Tab. 3.7: Pipettierschema zur Herstellung der HEMA-Arbeitslösungen AL I und II

	<i>V Stammlösung [ml]</i>	<i>V Arbeitslösung [ml]</i>	<i>c Arbeitslösung [mg/l]</i>
AL I	1	20	0,68
AL II	0,1	20	0,068

3.5.4 Messgeräte und chromatographische Bedingungen

Die Messung der Mercaptursäuren erfolgt mittels LC-MS/MS, wobei sowohl mit Electrospray-Ionization (ESI) als auch mit Atmospheric pressure chemical Ionization (APCI) ionisiert werden kann. Für die Ermittlung der spezifischen Ionenübergänge jedes Analyten und der optimalen Potentialeinstellungen entlang des Ionenpfades wird mit Hilfe der Software Analyst 1.1 eine „Quantitative Optimization“ für jeden Analyten durchgeführt. Dazu wird eine Methanol/Wasser 1:1 (V/V)-Lösung des Analyten in einer Konzentration von 500 ng/ml über die Spritzenpumpe des API 2000-Systems infundiert. Die daraus resultierenden gerätespezifischen Einstellungen und chromatographischen Bedingungen sind in Tab. 3.8 angegeben.

Tab. 3.8: HPLC-ESI- und APCI-MS/MS Bedingungen für die Bestimmung der Mercaptursäuren

Ionisierung		ESI	APCI
Injektion	Inj. Vol.	10 µl	10 µl
Binäre Pumpe	Flussrate	300 µl/min	700 µl/min
	Elution	Isokratisch	Isokratisch
Laufmittel		20 mM Ameisensäure/ Acetonitril 80:20	10 mM Ammoniumacetat/ Methanol 80:20
	Messdauer	3,5 min	4,0 min
Säulenofen	Temperatur	50 °C	50 °C
Säule	Luna C18 (2), Phenomenex	75 x 2 mm, 100 Å, 3 µ	75 x 3 mm, 100 Å, 3 µ
	Luna C8 (2), Phenomenex		150 x 3 mm, 100 Å, 3 µ

Massenspektrometer			Messdauer	3,4 min	3,906 min
			Cycle Time	0,930 s	0,930 s
			Scan Type	+ MRM	+ MRM
			Auflösung Q1	Unit	Unit
			Auflösung Q3	Unit	Unit
			MR Pause	5 ms	5 ms
			Curtain Gas	40,00	50,00
			Temperatur	450 °C	495 °C
			Gas 1	45,00	60,00
			Gas 2	80,00	15,00
			CAD	3,00	3,00
			NC	2,00	2,00
MMA				Potentiale	
Q1 Mass	Q3 Mass	Time		DP	31
178,1	119,1	150 ms		FP	340
				EP	-9
				CEP	18
				CE	19
				CXP	4
EMA				Potentiale	
Q1 Mass	Q3 Mass	Time		DP	16
192,1	133,1	150 ms		FP	360
				EP	-11,5
				CEP	10
				CE	23
				CXP	6
HPMA				Potentiale	
Q1 Mass	Q3 Mass	Time		DP	36
222,1	91,0	150 ms		FP	350
				EP	-7,5
				CEP	12
				CE	31
				CXP	4
HEMA				Potentiale	
Q1 Mass	Q3 Mass	Time		DP	31
208,0	162,0	150 ms		FP	360
				EP	-6,5
				CEP	10
				CE	13
				CXP	6

Fortsetzung Tab. 3.8:

CEMA			Potentiale	
Q1 Mass	Q3 Mass	Time	DP	66
217,2	175,0	150 ms	FP	360
			EP	-11,5
			CEP	10
			CE	15
			CXP	8
iPrMA			Potentiale	
Q1 Mass	Q3 Mass	Time	DP	46
206,3	147,0	150 ms	FP	200
			EP	-11,5
			CEP	12
			CE	19
			CXP	6

3.5.5 Probenaufarbeitung und Probenlagerung

3.5.5.1 Probenlagerung

Die Urinproben werden in 14 ml Röhrchen portioniert und bis zur Aufarbeitung bei –20 °C eingefroren. Eine Stabilisierung findet nicht statt. Die Verwendbarkeit beträgt mindestens 48 Monate.

3.5.5.2 Probenaufarbeitung durch Festphasenextraktion

Die Urinproben werden bei Raumtemperatur aufgetaut, durchgeschüttelt und zentrifugiert (10 °C, 3000 x g, 10 min). Der Überstand wird vorsichtig abgehoben, in ein neues 14 ml Röhrchen überführt und der pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf pH 2,5 eingestellt. Für eine Dreifachbestimmung werden 3 x 1 ml in 4 ml Braunglasfläschchen pipettiert und mit jeweils 100 µl IS Arbeitslösung I (50 mg/l) versetzt.

Anschließend erfolgt eine Festphasenextraktion mit dem Polymermaterial ENV+. Die Kartuschen werden mit 2 x 1 ml Methanol und 2 x 1 ml verdünnter Salzsäure pH 2,5 konditioniert. Nach Auftragen der Probe bei Atmosphärendruck werden die Kartuschen mit 3 x 500 µl verdünnter Salzsäure pH 2,5 gewaschen und trockengesaugt (Wasserstrahlpumpe, 750 mbar, 3 min).

Die Elution erfolgt mit insgesamt 1,2 ml 2 % Ameisensäurelösung in Methanol in ein 2 ml Eppendorfgefäß. Hierzu werden 500 µl der Lösung aufgetragen und nach 2 min Einwirkzeit mit leicht reduziertem Druck bei 920 mbar durchgesaugt, so dass eine tropfenweise Elution zu beobachten ist. Dieser Vorgang wird wiederholt. Um eine vollständige Elution zu erreichen, wird abschließend mit 200 µl der Lösung ohne Wartezeit nacheluiert und die Kartuschen bei 850 mbar für 2 min vollständig trockengesaugt. Die Probe wird an der Speedvac bei 100 mbar bis zur Trockene eingengt, in 1 ml 20 mM Ameisensäure/Acetonitril 80:20 (V/V) aufgenommen, kurz auf einem Tischschüttelgerät homogenisiert und in ein Analysenvial überführt. Anschließend erfolgt die analytische Bestimmung mittels LC-MS/MS. Können die Proben nicht sofort vermessen werden, sind sie bei –20 °C über 6 Monate stabil.

3.5.6 Identifizierung der Analyten

Die Identifizierung der gemessenen Substanzen erfolgte entsprechend ihrer Retentionszeiten und ihrer Ionenübergänge (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Identifizierung der Substanzen (LC-APCI-MS/MS)

<i>Substanz</i>	<i>RT</i> <i>[min]</i>	<i>Ionenübergang</i> <i>(m/z)</i>
N-Acetyl-S-methylcystein	0,70	178,1→119,1
N-Acetyl-S-ethylcystein	0,99	192,1→133,2
N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-cystein	0,60	217,2→175,1
N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-cystein	0,67	222,1→91,0
N-Acetyl-S-(2-hydroxyethyl)-cystein	0,67	208,0→162,0
N-Acetyl-S-isopropylcystein (IS)	1,64	206,3→147,0

Die Fullscan-Massenspektren, die zur Identifizierung der untersuchten Substanzen sowie des verwendeten internen Standards dienen, sind in Abschnitt (4.2.1.5.1) wiedergegeben.

3.5.7 Kalibrierung

Für die Erstellung der jeweiligen Kalibrierkurven wird ein Poolurin mit möglichst geringen Konzentrationen an Mercaptursäuren hergestellt. Dazu werden Urine mehrerer Nichtraucher mit möglichst geringer Grundbelastung gemischt. Es werden 11 x 1 ml Urin (S0 bis S10) portioniert und entsprechend des Pipettierschemas (Tab. 3.10) mit den Arbeitslösungen AL I, AL II und AL III (siehe 3.3.5.2) aus dem 4-Mix dotiert. Für HEMA werden entsprechend 8 x 1 ml Urin (HEMA MS 1 bis HEMA MS 8) portioniert und entsprechend des Pipettierschemas in Tab. 3.11 verfahren.

Alle dotierten Proben und der Nullwert des Pools werden, wie in Abschnitt 3.5.5.2 beschrieben, aufgearbeitet.

Tab. 3.10: Pipettierschema zur Kalibrierung mit MMA, EMA, HPMA und CEMA

		<i>V Dotierung</i>	<i>Konzentration [$\mu\text{g/l}$ Urin]</i>			
		[μl]	MMA	EMA	HPMA	CEMA
Stammlösung HPMA	MS 11	25	-	-	3325	-
Stammlösung HPMA	MS 10	10	-	-	1330	-
Stammlösung 4-Mix	MS 9	25	6250	6250	831	3125
AL I	MS 8	100	2500	2500	333	1250
AL I	MS 7	50	1250	1250	166	1250
AL I	MS 6	25	625	625	83	312
AL II	MS 5	100	250	250	33	125
AL II	MS 4	50	125	125	17	62
AL II	MS 3	25	63	63	8	31
AL III	MS 2	100	25	25	3	12
AL III	MS 1	50	13	13	1	6

Tab. 3.11: Pipettierschema zur Kalibrierung mit HEMA

		<i>V Dotierung</i> <i>[μl]</i>	<i>Konzentration</i> <i>[μg/l Urin]</i>
Stammlösung	HEMA MS 8	25 μ l	3400
Stammlösung	HEMA MS 7	10 μ l	1360
AL I	HEMA MS 6	100 μ l	680
AL I	HEMA MS 5	50 μ l	340
AL I	HEMA MS 4	25 μ l	170
AL II	HEMA MS 3	100 μ l	68
AL II	HEMA MS 2	50 μ l	34
AL II	HEMA MS 1	25 μ l	17

Von jedem Einzelflächenwert wird der Wert der Nullprobe des Pools abgezogen. Die Kalibriergeraden erhält man durch lineare Regression, wobei die Konzentration die unabhängige und QR die abhängige Variable ist.

3.5.8 Berechnung der Ergebnisse

Zur Berechnung der Konzentration werden für jede Probe die Quotienten aus den Peakflächen der zu bestimmenden Mercaptursäuren (MMA, EMA, HPMA, CEMA, HEMA) und der Peakfläche des internen Standards gebildet und für QR in die entsprechende Kalibriergerade eingesetzt. Man erhält die Konzentration in ng/ml Urin.

3.5.9 Validierung der Methode

Die Präzision der Methode wurde anhand eines Pools überprüft, der zur Bestimmung der Präzision in der Serie und der Präzision von Tag zu Tag insgesamt 48 mal aufgearbeitet wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.13 zusammengefasst. Zur Bestimmung der relativen Wiederfindungsrate werden Poolproben zur Bestimmung des Grundlevels mehrmals vermessen. Die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag wird durch Dotierexperimente bei

3 verschiedenen Konzentrationsbereichen ermittelt. Einen Überblick gibt Tab. 4.14 – 4.19. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen werden durch Dotierung von 1 ml PBS-Pufferlösung ermittelt (Tab. 4.20). Die Proben werden entsprechend Methode 3.5.5.2 aufgearbeitet und die Werte entsprechend 3.4.9.1 nach zwei verschiedenen Verfahren ermittelt. Die Linearität der Methode wird aus den mit Microsoft Excel berechneten Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten abgelesen (Tab. 4.21). Für die Bestimmung der Selektivität der Methode dient in erster Linie die Aufnahme von Q1-Fullscan-Massenspektren der Standardlösungen der Analyten und die automatische Bestimmung von spezifischen Ionenübergängen. Um die Spezifität zusätzlich überprüfen zu können, werden die Analyten in einer Konzentration von 10 µg/ml in Dichlormethan gelöst, zur Trockene eingeeengt und mit Diazomethan methyliert. Die Strukturen der entsprechenden Methylester werden mit GC/MS (EI) bestätigt. Die erhaltenen chromatographischen Retentionszeiten, Peakformen und Peakweiten vereinfachen die Identifizierung der Analyten in Realproben. Werden mehrere Ionenspuren pro Analyt gemessen, kann das aus den Q1-Spektren ermittelte Verhältnis der Ionenintensitäten zueinander zur Identifizierung herangezogen werden. Da keine deuterierten Standards zur Verfügung stehen, werden bei ausgewählten Realproben und Standards 3 Ionenübergänge pro Analyt gemessen. Während der Messung der Studienproben werden die Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Retentionszeiten und Peakweiten gebildet. Die Variationskoeffizienten dürfen bei der Auswertung der Retentionszeiten nicht mehr als 10 % und bei der Peakweite nicht mehr als 15 % betragen.

3.6 Analytik der Thioether

3.6.1 Prinzip der Methode

Die Bestimmung der Thioether im Urin erfolgt nach einer modifizierten Methode von Aringer und Lidums [241].

Durch Extraktion mit Ethylacetat können Thiole (R-SH) und Thioether (R-S-R') aus Urinproben isoliert werden. Die anschließende alkalische Hydrolyse führt zur Spaltung der Thioether, so dass im Hydrolysat R-SH- und R'-SH-Gruppen vorliegen. Die Bestimmung der SH-Konzentration erfolgt photometrisch durch Zugabe von DTNB (5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)).

Durch die Differenzbildung aus der SH-Konzentration nach alkalischer Hydrolyse und der SH-Konzentration vor alkalischer Hydrolyse erhält man die Thioether-Konzentration der Probe.

3.6.2 Kalibratoren

Die Kalibrierung erfolgt mit N-Acetyl-L-cystein als Standard. Stamm- und Arbeitslösung I sowie die einzelnen Verdünnungen sollten täglich frisch hergestellt und zwischen den Messungen bei +4 °C aufbewahrt werden.

N-Acetyl-L-cystein -Stammlösung (40 mMol)

In einem 100 ml Messkolben werden 0,65 g (0,004 Mol) N-Acetyl-L-cystein eingewogen und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Arbeitslösung I (0,4 mMol)

Um die Arbeitslösung I herzustellen, wird die Stammlösung 1:100 verdünnt. Dazu wird 1 ml der Stammlösung in einen 100 ml Messkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

3.6.3 Messgerät und -bedingungen

Die Messung der Extinktion erfolgt mit Hilfe des Spectro-Multikanal-Readers im Mikrotiterplattenverfahren bei einer Wellenlänge von 405 nm (ohne Kontrollwellenlänge). Da die Mikrotiterplatten vor der Messung bereits auf dem Orbitalschüttler geschüttelt werden, wird der Schüttelmodus im Reader nicht verwendet. Die Auswertung, wie Bildung der Mittelwerte und Berechnung der Differenzen aus Blind- und Messwerten und die Bedienung des Readers erfolgt über die Software Easy Fit Version 4.11.

Die Einteilung der Mikrotiterplatten ist in Abb. 3.2 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LW1		Pr1	Pr2	Pr3	Pr4	Pr5	Pr6	Pr7	Pr8	Pr9	Pr10
B	LW2		Pr1	Pr2	Pr3	Pr4	Pr5	Pr6	Pr7	Pr8	Pr9	Pr10
C	C 1	C 1	Pr1	Pr2	Pr3	Pr4	Pr5	Pr6	Pr7	Pr8	Pr9	Pr10
D	C 2	C 2	Pr1	Pr2	Pr3	Pr4	Pr5	Pr6	Pr7	Pr8	Pr9	Pr10
E	C 3	C 3										
F	C 4	C 4										
G	C 5	C 5										
H	C 6	C 6										

Abb. 3.2: Belegung der Mikrotiterplatten (LW = Leerwert, C 1 – C 6 = Eichreihe, Pr = Probe)

3.6.4 Entwicklung einer Mikromethode zur Bestimmung der Thioether

3.6.4.1 Probenlagerung

Die Urinproben werden in 250 ml Urinsammelflaschen bis zur Aufarbeitung bei – 20 °C eingefroren. Eine Stabilisierung findet nicht statt, die Stabilität der Proben wird nicht überprüft.

3.6.4.2 Probenaufarbeitung

Die Urinproben werden bei Raumtemperatur über Nacht aufgetaut und geschüttelt. Zur besseren Durchmischung bei der pH-Einstellung werden 20 ml Probe in Rollrand-Schnappdeckelgläschen gefüllt und unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer zunächst mit 4 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 1,9 und dann mit 1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von $1,75 \pm 0,05$ eingestellt. Die Proben werden anschließend zu jeweils 12 ml in 14 ml Röhrchen umgefüllt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei + 4 °C gelagert. Mit dem Inhalt eines Schnappdeckelgläschens lässt sich ein Röhrchen ganz und ein zweites für eine eventuelle Dreifachbestimmung bis zur Hälfte füllen.

Von allen Proben wird am selben Tag eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Validierung sollte bei jeder Extraktion eine Kontrollprobe mitgeführt werden, die zuvor 10-fach bestimmt wurde (siehe auch Thioether-Kontrollkarte, Anhang, 8.2, Abb. 8.3).

3.6.4.3 Extraktion

Die mit 12 ml Urin gefüllten Einmalreagenzröhrchen (wie unter 3.6.4.2 beschrieben) werden bei 3000 g und 20 °C für 5 min zentrifugiert. Um eine Doppelbestimmung durchzuführen, werden vom Überstand zweimal 5 ml entnommen und in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen pipettiert. Zur anschließenden Extraktion werden 8 ml Ethylacetat zugegeben. Die gut verschlossenen Gefäße werden für 10 min auf dem Multi-Tube-Vortexer geschüttelt und dann bei 3000 g und 20 °C für 5 min zentrifugiert. Die Röhrchen werden vorsichtig aus der Zentrifuge genommen, um eine Phasenvermischung zu vermeiden. Die obere organische Phase wird mit einer 5000 µl Varipette abgehoben und in für den LV Evaporator geeignete Kulturröhrchen aus Glas überführt. Um Verwirbelungen zu vermeiden, sollte möglichst langsam und nicht zu nah an der Phasengrenzfläche abgehoben werden. Die Extraktion wird zweimal wiederholt. Insbesondere bei der letzten Extraktion sollte die organische Phase möglichst vollständig und wasserfrei abgehoben werden. Der Extrakt wird im LV Evaporator bei 40 °C Wasserbadtemperatur bis zur Trockene eingengt. Der Vordruck am Gerät wird dabei zunächst für 2 min auf 2,5 Psi und für die restliche Zeit auf 5 Psi eingestellt. Die Proben sind in etwa 1,5 – 2 h eingengt. Sollte die weitere Durchführung der Methode aus zeitlichen Gründen erst am folgenden Tag möglich sein, können die Röhrchen mit Parafilm verschlossen über Nacht bei +4 °C gelagert werden.

3.6.4.4 Alkalische Hydrolyse

Die eingengten Proben werden auf Raumtemperatur gebracht. Die Rückstand wird in 2 ml Ascorbinsäurelösung (sollte Raumtemperatur haben, ev. kurz ins Ultraschallbad stellen) aufgenommen. Bei der Zugabe der Ascorbinsäurelösung sollte die Pipette am oberen Rand des Röhrchens rundherum entlang geführt werden, um den Rückstand vollständig in Lösung zu bringen.

Die Kulturröhrchen werden mit Parafilm verschlossen und auf dem Tischschüttelgerät für 45 s gut geschüttelt und in kleine Einmalreagenzröhrchen (8,5 ml Volumen) überführt, da aus den großen Glasröhrchen nicht mit einer Eppendorf-Pipette pipettiert werden kann. Die so wieder in Lösung gebrachte Probe wird im Pipettierschema (Tab. 3.12) als Extrakt 1 bezeichnet. Zur Durchführung des Ansatzes für die alkalische Hydrolyse werden zunächst 0,5 ml 4 N Natronlauge in Braungläschen vorgelegt. Das Wasserbad kann in der Zwischenzeit angeschaltet und auf eine Temperatur von 100 °C eingestellt werden. Danach wird 1 ml des

Extrakte in die Braunglasröhrchen pipettiert, welche die vorgelegte Natronlauge enthalten. Um eventuelle Oxidationsprozesse zu vermeiden, wird für 30 s Stickstoff eingeleitet. Die Stickstoffzufuhr erfolgt über einen Schlauch, an dessen Ende eine Pipettenspitze aus Plastik befestigt wird. Die Spitze wird an den Rand des Röhrchens gehalten, damit ein guter Gasaustausch gewährleistet ist. Der Druck sollte nur so stark eingestellt werden, dass sich die Oberfläche der Lösung leicht bewegt. Nach Einleitung des Stickstoffs werden die Röhrchen sofort verschlossen (Schraubdeckel mit Dichtung) und auf dem Tischschüttelgerät etwa 10 s geschüttelt. Die Extrakte werden 60 min bei 100 °C im Wasserbad hydrolysiert und danach 10 min im Eisbad gekühlt. Während der Spaltung werden die nicht hydrolysierten Proben (Extrakt 1, E1) in die Mikrotiterplatten pipettiert und im Multikanal-Reader gemessen. Das Pipettierschema sowie die genaue Einteilung der Platten wird unter 3.6.4.5 beschrieben.

Zu den abgekühlten alkalischen Proben wird 0,5 ml 4 M gepufferte Salzsäure pipettiert und die Probe 20 s auf dem Tischschüttelgerät vermischt. Dabei muss eine Probe nach der anderen neutralisiert und gemischt werden. Die Probe entspricht im später aufgeführten Pipettierschema (Tab. 3.12) Extrakt 2 (E2) und muss unmittelbar nach dem Mischen in die vorbereiteten Mikrotiterplatten pipettiert werden. Der ganze Vorgang muss zügig erfolgen, so dass zwischen Neutralisation und Messung im Multikanal-Reader nicht mehr als 30 min vergehen, da der Farbstoffkomplex über einen längeren Zeitraum nicht stabil ist. Aus diesem Grund sollten auch nicht mehr als 10 Proben parallel hydrolysiert und auf die Mikrotiterplatten aufgetragen werden.

3.6.4.5 Pipettierschema des Mikroansatzes

Für jeden Ansatz (E 1, E 2, E 3 und E 4) wird eine eigene Mikrotiterplatte verwendet. Dabei wird auf die Platten für die Extrakte E 1 und E 3 der Blindwert B 1 (= Leerwert 1) und auf die Platten für die Extrakte E 2 und E 4 der Blindwert B 2 (= Leerwert 2) mit aufgetragen. Auf den Mikrotiterplatten für die Ansätze E 2 und E 4 wird zusätzlich die Eichreihe (Doppelansatz) mitgeführt (genaue Einteilung der Platten siehe Abb. 3.3).

DTNB wird, im Gegensatz zu den anderen Lösungen, erst unmittelbar vor Zugabe der Extrakte in die Kavitäten pipettiert.

Tab. 3.12: Pipettierschema Mikrotiterplattenansatz (Extrakt 1 = vor Hydrolyse, Extrakt 2 = nach Hydrolyse, B = Leerwert, E1 – E4 = Bezeichnung der Mikrotiterplatten)

	<i>B 1</i>	<i>B 2</i>	<i>E 1</i>	<i>E 2</i>	<i>E 3</i>	<i>E 4</i>
	[μ l]	[μ l]	[μ l]	[μ l]	[μ l]	[μ l]
Puffer	200	200	200	200	200	200
DTNB		30		30		30
H ₂ O	55	25	30		30	
Extrakt 1			25	25		
Extrakt 2					25	25

Nach Zugabe aller Lösungen und Extrakte werden die Platten für 3 min bei 1100 Zyklen pro Minute auf dem Orbitalschüttler geschüttelt. Die Extinktion wird innerhalb von 30 min im Multikanal-Reader bei 405 nm gemessen.

3.6.5 Kalibrierung

Aus der Arbeitslösung I erhält man durch Verdünnen mit Wasser die Eichlösungen C 1 – C 6 (siehe Pipettierschema, Tab. 3.13). Dabei werden die jeweiligen Mengen der Arbeitslösung in einem 10 ml Messkolben vorgelegt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Tab. 3.13: Pipettierschema der Eichlösungen aus der N-Acetyl-L-Cystein Standardlösung

Eichlösung	<i>V AL I</i> [ml]	<i>V H₂O</i> [ml]	<i>Konzentration in</i> [μ mol/l Urin] (<i>C x 16000</i>)	<i>Verdünnungsfaktor</i>
C 1	1	9	16	1:10
C 2	2	8	32	1:5
C 3	4	6	64	1:2,5
C 4	6	4	96	1:1,67
C 5	8	2	128	1:1,125
C 6	10	0	160	-----

Zur Messung der Eichreihe in Mikrotiterplatten werden 200 µl Phosphatpuffer, 30 µl DTNB und jeweils 25 µl der Eichlösungen C 1 – C 6 in die Vertiefungen pipettiert. Als Blindwert werden anstelle der Eichlösung 25 µl H₂O zugegeben. Die Platte wird auf einem Orbitalschüttler für 3 min bei 1100 Zyklen pro Minute geschüttelt. Die Messung der Extinktion erfolgt im Multikanal-Reader bei 405 nm. Da zwischen Konzentration und Extinktion ein linearer Zusammenhang besteht, kann die spätere Auswertung der Messergebnisse über eine lineare Regression erfolgen. Die Extinktion der Eichlösungen wird gegen die Konzentration in µmol/l Urin aufgetragen. Die Angabe in µmol/l Urin ergibt sich durch Multiplikation der Konzentration mit dem Faktor 16000. Die Herleitung des Faktors wird unter 3.6.6 beschrieben.

Durch diese Umrechnung kann die Thioetherkonzentration aus der Kalibriergeraden direkt in µmol/l Urin ermittelt werden.

3.6.6 Berechnung der Ergebnisse

Die Extinktion ΔE ergibt sich aus: $\Delta E = 2 \cdot (E_4 - E_3) - (E_2 - E_1)$

Da 1 ml Extrakt 1 zur alkalischen Hydrolyse mit 0,5 ml 4 N Natronlauge und 0,5 ml 4 N gepufferter Salzsäure versetzt und somit 1 : 1 verdünnt wurde, muss die Differenz aus E 4 und E 3 mit 2 multipliziert werden (für E 1 und E 2 wurde der Extrakt 1 unverdünnt eingesetzt). Der bereits unter 3.6.5 erwähnte Umrechnungsfaktor $F = 16000$ ergibt sich durch folgende Berechnungen:

5 ml Urin entsprechen nach Extraktion und Abdampfen 2 ml Extrakt in Ascorbinsäurelösung (= Extrakt 1). Damit entsprechen die eingesetzten 0,025 ml Extrakt 1 einer ursprünglichen Menge von 0,0625 ml Urin $((0,025 \text{ ml} \cdot 5 \text{ ml}) / 2 \text{ ml})$. Die Angabe in µmol/0,0625 ml Urin muss mit 16000 multipliziert werden, um die Konzentration in µmol/l Urin zu erhalten. Dieser Umrechnungsfaktor wurde bereits bei der Ermittlung der Kalibriergeraden berücksichtigt, d. h., setzt man ΔE in die Gleichung der Kalibriergeraden ein, erhält man die Thioetherkonzentration in µmol/l Urin.

3.6.7 Validierung der Methode

Die Präzision der Methode wird anhand zweier Nichtraucherproben überprüft, die zur Bestimmung der Präzision in der Serie und der Präzision von Tag zu Tag insgesamt 23 bzw. 10 mal aufgearbeitet werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.24 zusammengefasst. Eine Bestimmung der absoluten und relativen Wiederfindungsrate findet nicht statt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze werden nach der Leerwert-Methode ermittelt. Die Linearität der Methode wird aus der mit Microsoft Excel berechneten Geradengleichung und dem Korrelationskoeffizienten abgelesen. Da in diesem Fall eine Sammelmethode vorliegt, kann keine Selektivität bestimmt werden. Hauptmodifikation der Methode stellt die Verwendung einer anderen Wellenlänge als in der von Aringer und Lidums [241] vorgeschlagenen dar. Um bei den Messungen mit dem Multikanal-Reader optimale Intensitäten bei gleichzeitig guten Korrelationen mit den Messwerten des Photometers zu erzielen, werden Versuche bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt und die ermittelten Werte mit Photometermessungen bei $\lambda = 412 \text{ nm}$ verglichen. Ausgewählte Urinproben der Studie Biomonitoring 2000 werden zur Kontrolle sowohl mit dem Photometer als auch mit dem Reader vermessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.25 zusammengefasst. Die Korrelation zwischen den Einzelproben ist in Abb. 4.34 gezeigt. Die während der Aufarbeitung der Studienproben erstellte Kontrollkarte ist im Anhang 8.2 (Abb. 8.3) gezeigt.

3.7 Bestimmung der 3-Alkyl-Adenin-Addukte

3.7.1 Prinzip der Methode

Die Bestimmung der Alkyladenine in Urin erfolgt nach einer neu entwickelten Methode. Durch Anreicherung an einer Mischphasen-SPE-Kartusche können die DNA-Addukte aus Urinproben isoliert werden. Als interner Standard dient das deuterierte Analoge des 3-Ethyladenins. Die anschließende Messung mit LC-MS/MS (jeweils 1 spezifischer Ionenübergang) ermöglicht eine selektive Bestimmung der Adenin-Addukte. Die Kalibrierung erfolgt durch Dotierung von PBS-Puffer mit den entsprechenden Standards, der analog zu den Urinproben aufgearbeitet wird.

3.7.2 Standardlösungen

Die wässrigen Standardlösungen und Kalibratoren werden bei +4 °C im Coldlab aufbewahrt und sind über 4 Monate verwendbar.

Die methanolischen Standardlösungen werden bei – 20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt und sind über 12 Monate verwendbar.

3-Ethyladenin-Lösung in Wasser

In einen 10 ml Messkolben werden 10 mg (61 µMol) 3-Ethyladenin eingewogen und mit Wasser (bidest) bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Stammlösung beträgt 1 mg/ml.

3-Methyladenin-Lösung in Wasser

In einen 10 ml Messkolben werden 10 mg (67 µMol) 3-Methyladenin eingewogen und mit Wasser (bidest) bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Stammlösung beträgt 1 mg/ml.

[D₅]-3-Ethyladenin-Lösung in Wasser

In einem 5 ml Messkolben werden 5,0 mg (30 µMol) [D₅]-3-Ethyladenin eingewogen und mit Wasser (bidest) bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Stammlösung beträgt 1 mg/ml.

9-Ethyladenin-Lösung in Methanol

In einen 10 ml Messkolben werden 10 mg (61 µMol) 9-Ethyladenin eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Stammlösung beträgt 1 mg/ml. Für die Arbeitslösung I werden 100 µl entnommen und auf 20 ml aufgefüllt. Die Konzentration dieser Arbeitslösung beträgt 5 µg/ml. 1 ml der Arbeitslösung I wird in einen 10 ml Messkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Die Konzentration der Arbeitslösung II beträgt 500 ng/ml.

1-Methyladenin-Lösung in Methanol

In einen 10 ml Messkolben werden 10 mg (67 µMol) 1-Methyladenin eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Stammlösung beträgt 1 mg/ml.

3-Ethyladenin-Lösung in Methanol

In einen 10 ml Messkolben werden 5 mg (30 μ Mol) 3-Ethyladenin eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Stammlösung beträgt 0,5 mg/ml.

3-Methyladenin-Lösung in Methanol

In einen 10 ml Messkolben werden 10 mg (67 μ Mol) 3-Methyladenin eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Stammlösung beträgt 1 mg/ml.

3.7.3 Kalibratoren

Aus den wässrigen Stammlösungen werden für die Kalibrierung Arbeitslösungen durch Verdünnen mit Wasser hergestellt. Einen Überblick gibt Tab. 3.14.

Tab. 3.14: Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen AL I bis III

	<i>3-Ethyladenin</i> <i>V Lösung</i>	<i>V Arbeitslösung</i> <i>[ml]</i>	<i>c Arbeitslösung</i> <i>[ng/ml]</i>
AL I	0,1 ml Stammlösung	10	10000
AL II	0,1 ml AL I	10	100
AL III	1 ml AL II	250	0,4
	<i>3-Methyladenin</i> <i>V Lösung</i>	<i>V Arbeitslösung</i> <i>[ml]</i>	<i>c Arbeitslösung</i> <i>[ng/ml]</i>
AL I	0,8 ml Stammlösung	10	80000
AL II	1 ml AL I	20	100
AL III	1 ml AL II	100	0,4

3.7.4 Messgerät und chromatographische Bedingungen

Für die Ermittlung der spezifischen Ionenübergänge jedes Analyten und der optimalen Potentialeinstellungen entlang des Ionenpfades wird mit Hilfe der Software Analyst 1.1 eine „Quantitative Optimization“ für jeden Analyten durchgeführt. Dazu wird eine Methanol/Wasser 1:1 (V/V)-Lösung des Analyten in einer Konzentration von 200 ng/ml über die Spritzenpumpe des API 2000-Systems infundiert. Die daraus resultierenden gerätespezifischen Einstellungen und chromatographischen Bedingungen sind in Tab. 3.15 angegeben.

Tab. 3.15: HPLC-APCI-MS/MS Bedingungen für die Bestimmung der Alkyl-Adenin-Addukte

Ionisierung			APCI		
Injektion			Inj. Vol.		
Binäre Pumpe			Flussrate		
			1000 µl/min		
			Elution		
			Gradientenelution		
Laufmittel			Zeit [min]	A [%]	B [%]
			0,00	95,0	5,0
			1,00	95,0	5,0
			4,00	20,0	80,0
			9,00	20,0	80,0
			9,01	95,0	5,0
			16,00	95,0	5,0
Messdauer			16,0 min		
Säulenofen			Temperatur		
			45 °C		
Säule			Synergi Max RP, Phenomenex		
			150 x 4,6 mm, 80 Å, 4 µ		
Massenspektrometer			Messdauer		
			8,998 min		
			Cycle Time		
			0,915 s		
			Scan Type		
			+ MRM		
			Auflösung Q1		
			Low		
			Auflösung Q3		
			Unit		
			MR Pause		
			5 ms		
			Curtain Gas		
			30,00		
			Temperatur		
			495 °C		
			Gas 1		
			70,00		
			Gas 2		
			20,00		
			CAD		
			2,00		
			NC		
			2,00		
[D₅]-3-EtAde			Potentiale		
Q1 Mass	Q3 Mass	Time	DP		
169,0	137,0	300 ms	FP		
			EP		
			CEP		
			CE		
			CXP		

Fortsetzung Tab. 3.15:

3-EtAde			Potentiale	
Q1 Mass	Q3 Mass	Time	DP	41
164,0	136,0	300 ms	FP	310
			EP	-11,5
			CEP	8
			CE	27
			CXP	6
3-MeAde			Potentiale	
Q1 Mass	Q3 Mass	Time	DP	51
150,0	123,0	300 ms	FP	250
			EP	-8,5
			CEP	8
			CE	29
			CXP	4
9-EtAde			Potentiale	
Q1 Mass	Q3 Mass	Time	DP	41
164,0	136,0	300 ms	FP	310
			EP	-11,5
			CEP	8
			CE	27
			CXP	6

3.7.5 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von 3-Alkyladeninen

3.7.5.1 Lagerung der Proben

Die Urinproben werden in 250 ml Urinsammelflaschen bis zur Aufarbeitung bei – 20 °C eingefroren. Eine Stabilisierung findet nicht statt, die Stabilität der Proben wird nicht überprüft.

3.7.5.2 Probenvorbereitung

Die Urinproben werden bei Raumtemperatur über Nacht aufgetaut und durchgeschüttelt. Unter ständigem Rühren wird der pH-Wert mit 4 N Kalilauge auf einen Wert von 7,2 – 7,4 eingestellt. 50 ml der Probe werden anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen umgefüllt, mit 100 µl IS AL I (20 ng abs.) und 100 µl 9-Ethyladenin AL II (50 ng abs.) dotiert und zentrifugiert (20 °C, 3300 g, 10 min). Von allen Proben wird am selben

Tag eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Festphasenextraktion erfolgt mit Oasis MCX-Kartuschen, die vor dem Auftragen der Urinproben mit 6 ml Methanol und 6 ml PBS-Puffer konditioniert werden. Dabei verbleibt ca. 1 ml PBS-Puffer auf der Kartusche, da die SPE-Säulen bis zur sauren Fixierung der Analyten nicht trockenlaufen sollen. Der Urin wird über 30 min ohne Vakuum mittels einer 5 ml Pipette vorsichtig auf die Kartusche aufgegeben, wobei darauf zu achten ist, dass der Bodensatz in den Zentrifugenröhrchen nicht aufgewirbelt wird. Die Absperrhähne der SPE-Einsätze werden geschlossen, sobald die letzten Urintropfen in die Abdeckfritte der Kartusche gesickert sind.

3.7.5.3 Fixierung und Reinigung

Nachdem 50 ml Urin aufgegeben sind, wird die Kartusche mit 6 ml PBS-Puffer gewaschen und die Analyten mit 6 ml 0,1 M Salzsäure fixiert. Nach der Fixierung wird überschüssige Säure durch Anlegen von Vakuum (Wasserstrahlpumpe, 750 mbar, 1 min) entfernt. Zur weiteren Reduzierung der Matrix wird nacheinander mit 6 ml Methanol, 10 ml Toluol und 6 ml Ethylacetat gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wird das Lösungsmittel durch Anlegen von Vakuum (Wasserstrahlpumpe, 750 mbar, 1 min) entfernt. Die Kartuschen werden zentrifugiert (20 °C, 3300 g, 10 min) und mit Stickstoff trockengeblasen (2 bar Vordruck, 1 min pro Kartusche). Eventuell noch vorhandene Feuchtigkeitsspuren werden so sicher entfernt und können die Elution nicht beeinflussen.

3.7.5.4 Elution, Aufnahme und Lagerung

Die Probe wird mit 2 x 3 ml einer Lösung von 5 % Methanol in ammoniakgesättigtem Ethylacetat in graduierte 4 ml Gläschen ohne Vakuum eluiert. Dazu trägt man 3 ml der Elutionslösung auf, lässt sie 1 min einwirken und öffnet den Hahn so weit, dass eine tropfenweise Elution sichergestellt ist. Nachdem die 3 ml durchgelaufen sind, wird die Kartusche trockengesaugt (Wasserstrahlpumpe, 750 mbar, 1 min), das Eluat in einem Reacti-Therm bei 55 °C unter Stickstoff zur Trockene eingeengt und die Elutionsprozedur wiederholt. Der Rückstand wird in 20 µl Methanol aufgenommen, zur Lösung eventuell an der Glaswand haftender Probenrückstände auf einem Rollenmischer 5 min gerollt und anschließend mit 20 µl Wasser verdünnt. Das Gläschen wird zentrifugiert (20 °C, 3300 g, 5 min) und die Lösung in ein 100 µl Mikroprobengefäß überführt. Kann die Probe nicht sofort gemessen werden, wird sie bei -20 °C gelagert und ist mindestens 1 Woche stabil.

3.7.6 Identifizierung der Analyten

Die Identifizierung der gemessenen Substanzen erfolgte entsprechend ihrer Retentionszeiten und ihrer Ionenübergänge (Tab. 3.16).

Tab. 3.16: Identifizierung der Substanzen (LC-APCI-MS/MS)

<i>Substanz</i>	<i>RT</i> <i>[min]</i>	<i>Ionenübergang</i> <i>(m/z)</i>
3-Methyladenin	4,54	150,0→123,0
[D ₅]-3-Ethyladenin	5,07	169,0→137,0
3-Ethyladenin	5,09	164,0→136,0
9-Ethyladenin	5,49	164,0→136,0

Die Fullscan-Massenspektren, die zur Identifizierung der untersuchten Substanzen sowie des eingesetzten internen Standards dienten, sind in Abschnitt (4.4.1.5) wiedergegeben.

3.7.7 Kalibrierung

Für die Erstellung der jeweiligen Kalibrierkurven werden 2,0 l PBS-Puffer auf einen pH-Wert von pH 7,25 eingestellt. 13 x 50 ml (S0 bis S12) werden in 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen portioniert und entsprechend des Pipettierschemas (Tab. 3.17) mit den Arbeitslösungen AL I, AL II und AL III (siehe 3.7.2) dotiert. Die dotierten PBS-Pufferproben und der Leerwert werden wie in Abschnitt 3.7.5 beschrieben aufgearbeitet.

Die Messwerte des Doppelansatzes werden gemittelt, die Kalibriergeraden erhält man durch lineare Regression, wobei die Konzentration die unabhängige und QR (der Quotient aus der Peakfläche des jeweiligen 3-Alkyladenins und der Peakfläche des [D₅]-3-Ethyladenins) die abhängige Variable ist.

Tab. 3.17: Dotierung der PBS-Pufferproben zur Kalibrierung der 3-Alkyladenine

<i>Standard</i>	<i>3-Methyladenin V Dotierung</i>	<i>Konzentration on column [ng]</i>	<i>3-Ethyladenin V Dotierung</i>	<i>Konzentration on column [pg]</i>
S0	-	-	-	-
S1	10 µl AL III	0,01	10 µl AL III	1
S2	25 µl AL III	0,025	25 µl AL III	2,5
S3	50 µl AL III	0,05	50 µl AL III	5
S4	10 µl AL II	0,25	100 µl AL III	10
S5	100 µl AL II	2,5	500 µl AL III	50
S6	1000 µl AL II	25	1000 µl AL III	100
S7	10 µl AL I	200	10 µl AL II	250
S8	25 µl AL I	500	25 µl AL II	625
S9	50 µl AL I	1000	50 µl AL II	1250
S10	100 µl AL I	2000	100 µl AL II	2500
S11	-	-	200 µl AL II	5000
S12	-	-	400 µl AL II	10000

3.7.8 Berechnung der Ergebnisse

Zur Berechnung der Konzentration der 3-Alkyladenine werden für jede Probe die Quotienten aus den Peakflächen der zu bestimmenden Analyten (3-MeAde, 3-EtAde) und der Peakfläche des internen Standards gebildet und für QR in die entsprechende Kalibriergerade eingesetzt. Man erhält die Menge in ng pro Injektion.

3.7.9 Validierung der Methode

Die Präzision der Methode wird mittels zweier Poolurine überprüft, die zur Bestimmung der Präzision in der Serie und der Präzision von Tag zu Tag jeweils 18 mal aufgearbeitet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.27 zusammengefasst. Zur Bestimmung der relativen Wiederfindungsrate werden Proben des Poolurins I mit 2 verschiedenen Konzentrationen der wässrigen Standardlösungen dotiert und vermessen. Einen Überblick geben die Tabellen 4.29 und 4.30. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze werden durch Dotierung von 50 ml PBS-Pufferlösung ermittelt. Die Proben werden entsprechend Methode 3.7.5 aufgearbeitet

und die Werte entsprechend 3.4.9.1 nach zwei verschiedenen Verfahren [242] ermittelt. Für Realproben wird nach der gleichen Methodik verfahren. Die Linearität der Methode wird aus den mit Microsoft Excel berechneten Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten abgelesen (Tab. 4.32). Die erhaltenen chromatographischen Retentionszeiten, Peakformen und Peakweiten vereinfachen die Identifizierung der Analyten in Realproben. Werden mehrere Ionenspuren pro Analyt gemessen, kann das Verhältnis der Ionenintensitäten zueinander zur Identifizierung herangezogen werden. Der deuterierte Standard trägt zur Bestimmung der Selektivität insofern mit bei, als seine Retentionszeit auf Grund der geringeren Polarität nur wenige Sekunden kürzer ist und er mit 3-Ethyladenin quasi ko-eluiert. Da für 3-Methyladenin kein deuterierter Standard zur Verfügung steht, werden bei ausgewählten Realproben und Standards 2 Ionenübergänge pro Analyt gemessen. Während der Messung der Studienproben werden die Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Retentionszeiten von 9-EtAde gebildet. Der Variationskoeffizient darf nicht größer als 5 % sein.

3.8 Messung weiterer Biomarker

3.8.1 Bestimmung von Cotinin im Plasma und Urin

Das angewandte Verfahren ermöglicht die Bestimmung von Cotinin im Plasma, Speichel, Serum und Urin und beruht auf einer Methode von Feyerabend und Russel [239]. Cotinin ist ein wichtiges Stoffwechselprodukt des Tabakalkaloids Nikotin und kann nach Tabakrauchexposition frei und als Glucuronid gebunden in Urin nachgewiesen werden. Freies Cotinin ist auch im Blutplasma, Speichel sowie diversen Geweben zu finden [243-251].

Zur Bestimmung wird Cotinin nach Alkalisierung der wässrigen Matrix in einem raschen Elutionsschritt in Dichlormethan überführt. Anschließend wird ein Aliquot des Extraktes kapillargaschromatographisch aufgetrennt und mittels eines stickstoffspezifischen Detektors (NPD) gemessen. Die Kalibrierung erfolgt mit wässrigen Cotininlösungen im Konzentrationsbereich von 0 – 200 ng/ml für Plasma- und Serumproben bzw. von 0 – 2000 ng/ml für Urinproben. Zur Quantifizierung wird das Strukturanaloge *ortho*-Cotinin als interner Standard verwendet. Mit dieser Methode wird nur das freie Cotinin erfasst.

3.8.2 Bestimmung von Nikotin aus der Luft auf Personalsamplern

Die Bestimmung von Nikotin auf Personalsamplern erfolgt nach einer Methode von Ogden et al. [240]. Ein Personalsampler besteht aus einem mit Natriumhydrogensulfat behandelten Filter als Adsorbermaterial und einer davor angebrachten Membran mit definierten Diffusionsraten. Nach Extraktion der Filter mit ammoniakalischem Heptan wird Nikotin kapillargaschromatographisch aufgetrennt und mittels eines stickstoffspezifischen Detektors (NPD) gemessen. Als interner Standard dient *N*-Ethylnornikotin. Die Umrechnung der erhaltenen Werte auf $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft erfolgt unter Zuhilfenahme standardisierter Literaturdaten (Diffusionsraten für Nikotin 31,5 ml/min).

3.8.3 Thiocyanat in Plasma

Das verwendete Verfahren ermöglicht die Bestimmung von Thiocyanat in Plasma und Speichel. Grundlage ist die von Degiampietro et al. publizierte Methode [252]. Die Messung erfolgt photometrisch ohne vorherige Deproteinierung oder Dialyse. Eisen(III)-Ionen bilden mit Thiocyanationen einen rotgefärbten Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 460 nm. Chlorid bildet mit Eisen(III)-Ionen ebenfalls einen farbigen Komplex, Überlagerungen sind jedoch bei Wellenlängen über 460 nm vernachlässigbar. Den Probennullwert ermittelt man durch Zugabe von Quecksilber(II)-nitrat, das einen farblosen $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -Komplex bildet. Die Kalibrierung erfolgt mit wässrigen Lösungen von Ammoniumthiocyanat.

3.8.4 Bestimmung von Kreatinin

Die verwendete Methode ermöglicht die Bestimmung von Kreatinin in Urin. Das Prinzip ist eine modifizierte Jaffe-Reaktion ohne Enteiweißung und photometrischer Messung bei 492 nm [237,238]. Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure eine gelb-orange gefärbte Verbindung. Bei niedrigen Pikrinsäure-Konzentrationen unterbleibt die Eiweißfällung.

3.8.5 Genotypisierung

Zur Ermittlung der individuellen, genetisch festgelegten Ausstattung mit Glutathion-S-Transferasen vom Typ μ (Mu), θ (Theta) und π (Pi) werden Genotypisierungen unter Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Mit der vorliegenden Methode kann bestimmt werden, ob im Genom der Probanden beide Allele der Gene für die Glutathion-S-Transferasen Mu, Theta oder Pi (GSTM1, GSTT1, GSTP1) fehlen (0/0 Genotyp), oder ob zumindest ein Allel vorhanden ist. Die Genotypisierung der Studienproben erfolgte an Leukozyten-DNA im Rahmen der Doktorarbeit von Herrn Patrick Kosytorz (Medizinische Fakultät der LMU München) [253]. Die Zellen werden dazu lysiert und die freigesetzte DNA isoliert. Mittels PCR werden definierte Genabschnitte für die interessierenden Enzyme so stark vervielfältigt, dass man die entstandenen Produkte gelelektrophoretisch nachweisen kann. Zur Kontrolle können die fraglichen Banden mit Restriktionsenzymen geschnitten und die entstandenen Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt werden [254].

Für die Bestimmung der genetischen Polymorphismen der Glutathion-S-Transferasen M1 und T1 wird das Prinzip der Multiplex-PCR angewandt [255]. Vorteil dieser Methode ist der gleichzeitige Einsatz mehrerer Primerpaare in einer Reaktion. Somit können in einem PCR-Ansatz verschiedene Genabschnitte vervielfältigt werden. Die vollständige Deletion oder das Vorhandensein mindestens eines GSTM1-Allels wird durch die Abwesenheit oder das Vorhandensein einer Bande der Größe 218 bp angezeigt. Im Falle des GSTT1-Gens ist der Abschnitt 459 bp groß. Für die Glutathion-S-Transferase P1 wird für die Mutation im Exon 5 eine entsprechende Methode nach Harries [256] angewandt. Die PCR-Produkte mit einer Länge von 176 bp werden dazu aus 100 ng genomischer DNA amplifiziert und anschließend durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *BsmA I* auf das Vorliegen eines A nach G-Austauschs untersucht. Der Wildtyp an Position 313 wird als Allel GSTP1*a, die A313G-Variante als Allel GSTP1*b bezeichnet. Die Allelfrequenz beträgt 28 %. Das Exon 6 des GSTP1-Gens umfassende PCR-Produkt mit einer Länge von 420 bp wird nach Amplifizierung aus genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym *Aci I* gespalten und auf des Vorliegen eines C nach T-Austausches untersucht [257]. Die Allelfrequenz beträgt 9 %.

4. Ergebnisse

4.1 Hämoglobinaddukte

4.1.1 Globinisolierung und Synthese deuterierter Standards

Humanglobin

Aus 10,0 g (155,0 μMol) Humanhämoglobin wird nach Methode 3.4.5 Globin isoliert und gereinigt.

Ausbeute: 4,39 g (68,1 μMol , 44 %)

[D₃]-CyEtVal-PFPTH

Die Umsetzung von 2,0 g (31,0 μMol) Humanhämoglobin mit 1,0 g (17,8 mMol) [D₃]-Acrylnitril liefert nach der Fällung Globin mit deuteriertem Addukt.

Ausbeute: 445,5 mg (6,9 μMol , 23 %)

Literatur [201]: 968,5 mg (15,0 μMol , 50 %)

[D₃]-MeVal-PFPTH

Die Umsetzung von 1,0 g (15,5 μMol) Humanhämoglobin mit 1,0 g (6,9 mMol) [D₃]-Methyliodid liefert nach der Fällung Globin mit deuteriertem Addukt.

Ausbeute: 489,4 mg (7,6 μMol , 51 %)

Literatur [201]: 479,8 mg (7,4 μMol , 50 %)

[D₅]-EtVal-PFPTH

Die Umsetzung von 5,0 g (77,5 μMol) Humanhämoglobin mit 5,0 g (31,1 mMol) [D₅]-Ethyliodid liefert nach der Fällung Globin mit deuteriertem Addukt.

Ausbeute: 2,64 g (40,8 μMol , 55 %)

Literatur [201]: 2,40 g (37,1 μMol , 50 %)

4.1.2 Validierung der Methoden

4.1.2.1 Präzision

4.1.2.1.1 Präzision der Methode mit SPE (Methode 3.4.5.4.1)

Die Präzision der Methode wurde anhand eines Nichtraucher/Passivraucherpools und eines Raucherpools überprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.1 angegeben.

Tab. 4.1: Präzision der Methode (3.4.5.4.1); Werte in pmol/g Globin

<i>Anzahl Proben</i>		<i>MeVal</i>	<i>EtVal</i>	<i>CyEtVal</i>
N = 7 an 8 Tagen Raucher	MW	451,1	52,6	92,0
	STABW	30,7	9,9	8,7
	VK	6,8	18,9	9,5
N = 6 Raucher	MW	455,1	47,4	97,7
	STABW	9,9	9,2	4,7
	VK	2,2	19,3	4,9
N = 7 an 7 Tagen Nichtraucher	MW	375,5	63,9	42,3
	STABW	19,1	10,6	3,3
	VK	5,1	16,6	7,8
N = 6 Nichtraucher	MW	401,0	56,3	49,1
	STABW	24,4	11,8	3,1
	VK	6,1	21,0	6,4

4.1.2.1.2 Präzision der Methode ohne SPE (Methode 3.4.5.4.2)

Die Ergebnisse der Wiederholbarkeit und Genauigkeit sind in Tab. 4.2 angegeben.

Tab. 4.2: Präzision der Methode (3.4.5.4.2); Werte in pmol/g Globin

<i>Anzahl Proben</i>		<i>MeVal</i>	<i>EtVal</i>	<i>HyEtVal</i>	<i>CyEtVal</i>
N = 20 an 14 Tagen	MW	293,4	112,3	38,6	34,0
	STABW	25,1	13,9	5,3	4,5
	VK	8,5	12,4	13,7	13,3

Fortsetzung Tab. 4.2:

<i>Anzahl Proben</i>		<i>MeVal</i>	<i>EtVal</i>	<i>HyEtVal</i>	<i>CyEtVal</i>
N = 16 an 6 Tagen	MW	306,7	112,8	41,2	36,6
	STABW	15,4	11,9	4,6	2,9
	VK	5,0	10,5	11,1	7,9
N = 20 an 4 Tagen	MW	309,1	112,0	41,7	36,6
	STABW	3,6	5,0	1,8	0,9
	VK	1,2	4,5	4,4	2,5

4.1.2.2 Wiederfindungsrate

4.1.2.2.1 Absolute Wiederfindungsrate

Eine absolute Wiederfindungsrate kann nicht bestimmt werden, da die Konzentration des deuterierten internen Standards (IDS) nicht bekannt ist. Dies liegt daran, dass nicht ermittelt werden kann, wie groß die Ausbeute der Alkylierung des Globins mit der deuterierten Substanz ist. Für den EtOEtVal-Standard (IS) ist die Konzentration zwar bekannt, allerdings ist nicht geklärt, wie gut die Wiederfindungsrate tatsächlich mit der von HyEtVal übereinstimmt und wie hoch die Ausbeute der Derivatisierungsreaktion ist.

4.1.2.2.2 Relative Wiederfindungsrate

Die Ergebnisse der Dotierexperimente und die Wiederfindungsraten sind in den Tabellen 4.3 – 4.6 angegeben.

Tab. 4.3: Grundlevel an Addukten in Poolproben (N = 6) in pmol/g Globin

	<i>EtOEt [FE]</i>	<i>MeVal</i>	<i>EtVal</i>	<i>HyEtVal</i>	<i>CyEtVal</i>
MW	291459	260,3	73,3	29,3	1,4
STABW	24095	16,0	8,4	2,2	0,3
VK	8,3	6,1	11,4	7,6	23,3

Tab. 4.4: 13 Poolproben dotiert mit 2 ng absolut; Werte in pmol/g Globin

	<i>EtOEt [FE]</i>	<i>MeVal</i>	<i>EtVal</i>	<i>HyEtVal</i>	<i>CyEtVal</i>
Sollwert		412,8	211,1	153,4	118,9
MW gef.	274508	415,7	225,7	120,2	50,6
STABW	35634	23,6	17,3	11,1	7,6
VK	13,0	5,7	7,6	9,2	15,1
MW WFR [%]		100,7	106,9	78,4	42,6
STABW WFR		5,7	8,2	7,2	6,4
VK		5,7	7,6	9,2	15,1

Tab. 4.5: 10 Poolproben dotiert mit 5 ng absolut; Werte in pmol/g Globin

	<i>EtOEt [FE]</i>	<i>MeVal</i>	<i>EtVal</i>	<i>HyEtVal</i>	<i>CyEtVal</i>
Sollwert		641,4	410,0	339,3	295,3
MW gef.	274299	659,2	433,9	248,1	113,9
STABW	20439	19,8	15,6	27,4	6,5
VK	7,5	3,0	3,6	11,0	5,8
MW WFR [%]		102,8	103,9	73,1	38,6
STABW WFR		3,1	3,7	8,1	2,2
VK		3,00	3,60	11,03	5,70

Tab. 4.6: 6 Poolproben dotiert mit 10 ng absolut; Werte in pmol/g Globin

	<i>EtOEt [FE]</i>	<i>MeVal</i>	<i>EtVal</i>	<i>HyEtVal</i>	<i>CyEtVal</i>
Sollwert		1022,6	762,0	649,6	588,9
MW gef.	243022	1078,7	793,2	464,2	191,3
STABW	23113	47,4	29,4	33,0	16,0
VK	9,5	4,4	3,7	7,1	8,3
MW WFR [%]		105,5	104,1	71,5	32,5
STABW WFR		4,6	3,9	5,1	2,7
VK		4,4	3,7	7,1	8,3

4.1.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

In Tab. 4.7 sind die Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BSG) für die neuentwickelte Methode (mit SPE) angegeben.

Tab. 4.7: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Methode 3.4.5.4.1 (SPE)

<i>Analyt</i>	<i>Verfahren</i>	<i>NWG</i>		<i>BSG</i>	
		[pmol/g Globin]	[µg/l Blut]	[pmol/g Globin]	[µg/l Blut]
MeVal	Leerwert	67,64	1,39	304,39	6,27
	Signal/Rauschen	23,78	0,49	158,17	3,26
EtVal	Leerwert	113,87	2,60	512,40	11,68
	Signal/Rauschen	10,59	0,24	168,13	3,83
CyEtVal	Leerwert	44,36	1,19	199,62	5,33
	Signal/Rauschen	20,32	0,54	119,48	3,19

Die Nachweisgrenze für die nach Methode 3.4.5.4.2 gemessenen Proben wurde analog berechnet. Einen Überblick über die so erhaltenen Werte gibt Tab. 4.8.

Tab. 4.8: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Methode 3.4.5.4.2 (LLE)

<i>Analyt</i>	<i>Verfahren</i>	<i>NWG</i>		<i>BSG</i>	
		[pmol/g Globin]	[µg/l Blut]	[pmol/g Globin]	[µg/l Blut]
MeVal	Leerwert	46,4	1,0	154,5	3,2
	Signal/Rauschen	5,9	0,1	19,7	0,4
EtVal	Leerwert	35,6	0,8	118,7	2,7
	Signal/Rauschen	5,7	0,1	19,0	0,2
CyEtVal	Leerwert	8,7	0,2	29,0	0,8
	Signal/Rauschen	4,0	0,1	13,5	0,4
HyEtVal	Leerwert	13,7	0,4	45,5	1,2
	Signal/Rauschen	8,6	0,2	28,7	0,7

4.1.2.4 Linearität

Die Methoden zeigen im Bereich von 0,5 bis 1800 pmol/g Globin für alle Analyten lineares Verhalten. Die entsprechenden Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten sind in Tab. 4.9 angegeben.

Tab. 4.9: Korrelationskoeffizienten der Analyten bezogen auf den jeweiligen IS

<i>Analyt</i>	<i>SPE^a</i>		<i>LLE^b</i>	
	Geradengleichung	Korr.-Koeffizient	Geradengleichung	Korr.-Koeffizient
MeVal	$y = 0,0055 x + 0,0488$	$R^2 = 0,9990$	$y = 0,0056 x + 0,0299$	$R^2 = 0,9994$
EtVal	$y = 0,0015 x + 0,0248$	$R^2 = 0,9992$	$y = 0,0039 x + 0,0257$	$R^2 = 0,9996$
HyEtVal	-	-	$y = 0,0031 x + 0,0225$	$R^2 = 0,9996$
CyEtVal	$y = 0,0020 x + 0,0151$	$R^2 = 0,9988$	$y = 0,0017 x + 0,0070$	$R^2 = 0,9993$

a: bezogen auf den jeweiligen deuterierten Standard

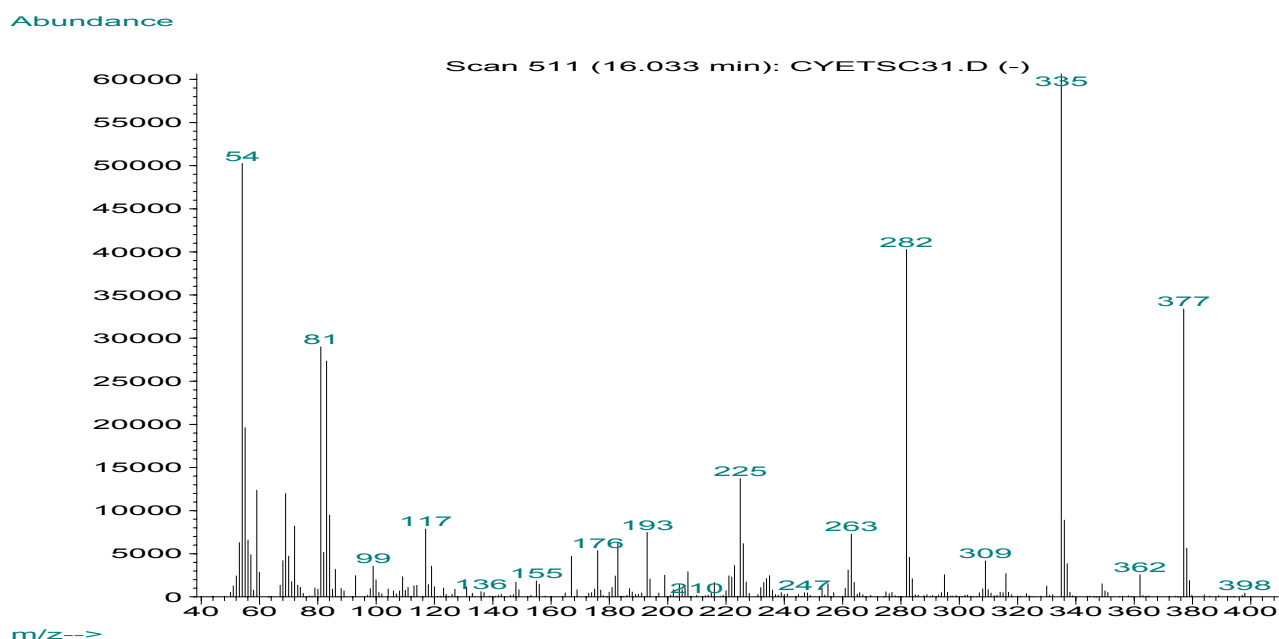
b: alle Analyten bezogen auf EtOEtVal-PFPTH

4.1.2.5 Selektivität

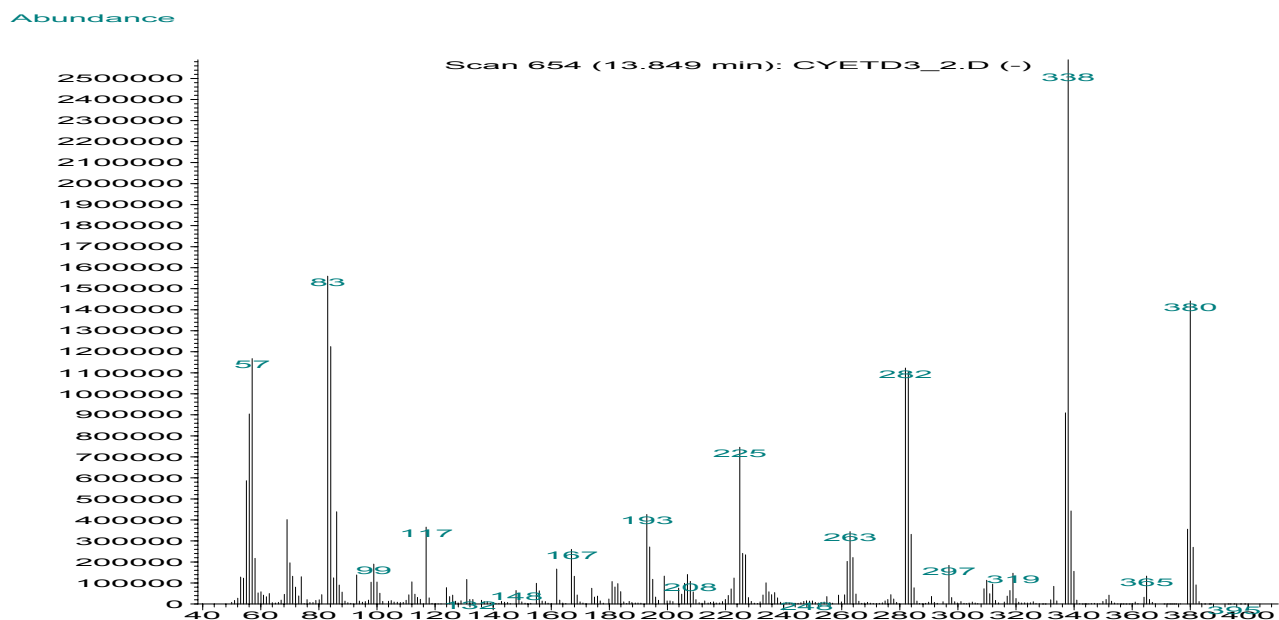
4.1.2.5.1 Charakterisierung der Analyten und internen Standards durch Massenspektrometrie

Von den deuterierten und undeuterierten Pentafluorophenyl-thiohydantoinen sowie vom internen Standard (IS) wurden EI- bzw. NICI/EC-Fullscan-Massenspektren aufgezeichnet, die in den Abb. 4.1 bis 4.14 wiedergegeben sind. Die NICI(EC)-MS-Spektren von CyEtVal-PFPTH sowie von $[D_3]$ -CyEtVal-PFPTH in Toluol entsprechen den Literaturdaten [197] und werden nicht gezeigt. Alle gezeigten Spektren sind Background-subtrahiert aufgezeichnet. Die gemessenen und berechneten Isotopenhäufigkeiten sind im Anhang 8.3 (Tab. 8.3 – 8.18) gezeigt.

Abb. 4.1: EI/MS-Spektrum von CyEtVal-PFPTH in Toluol

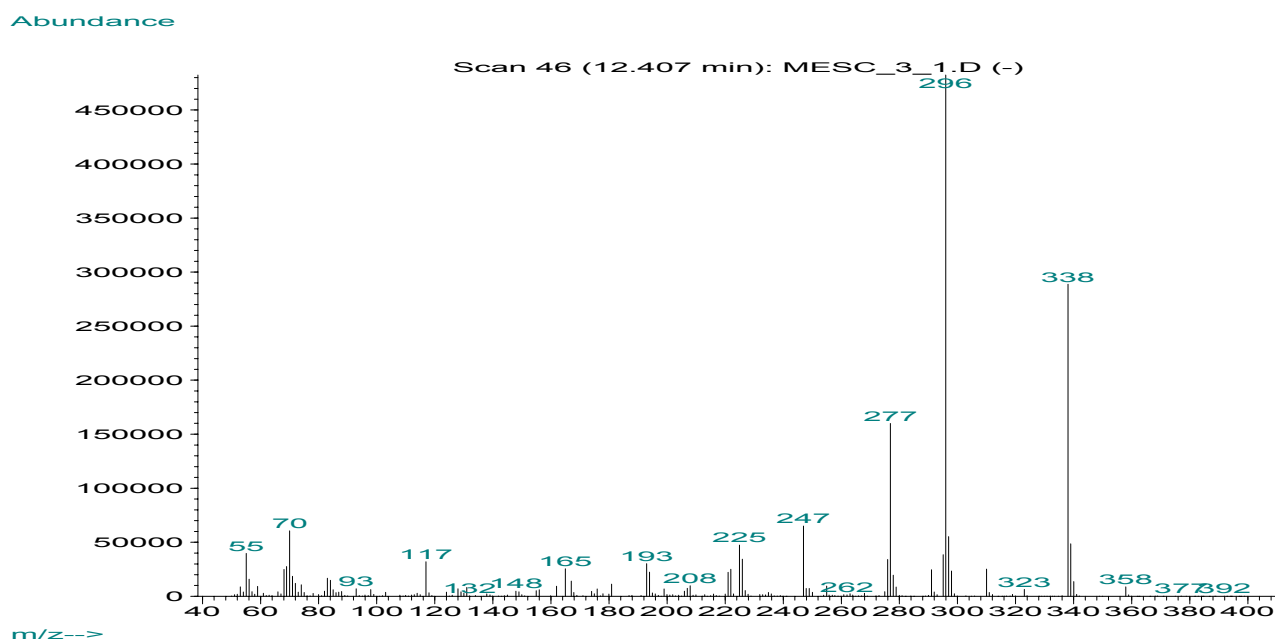


m/z (%): 377 (55) [M], 362 (4) [M-CH₃], 349 (2) [M-CO], 335 (100) [M-C₃H₆], 316 (5), 309 (7) [M-CH₃-R], 282 (66) [M-C₃H₆-R], 263 (12), 225 (23) [C₆F₅NCS], 193 (12), 167 [C₆F₅] (8)

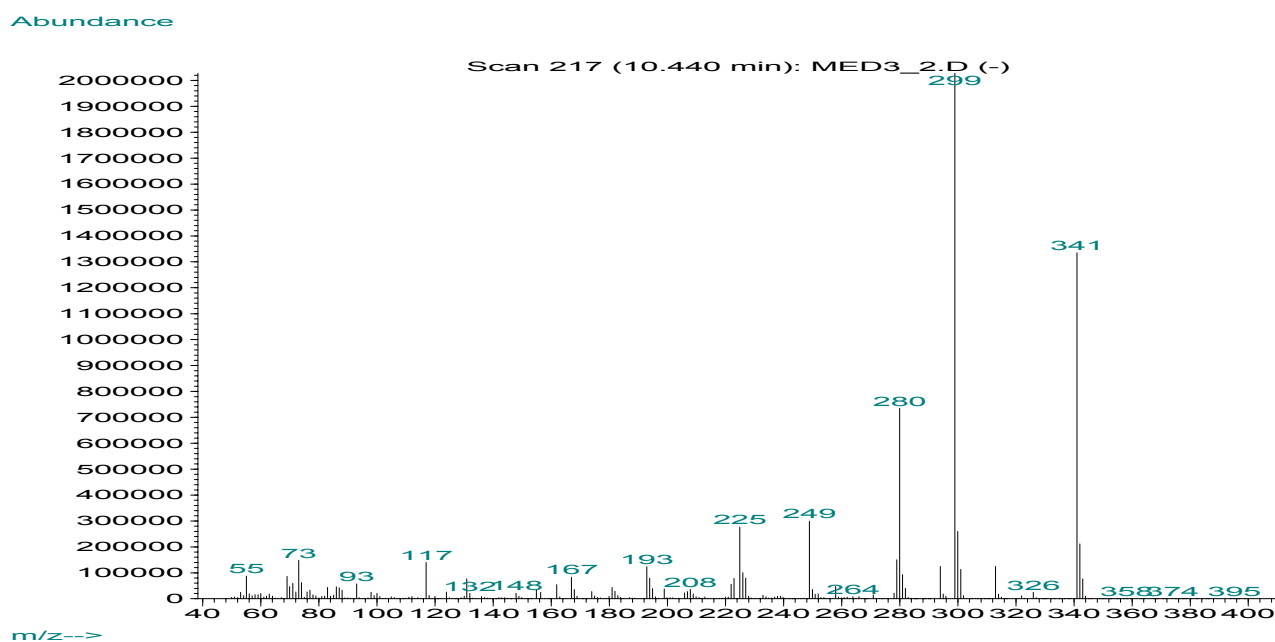
Abb. 4.2: EI/MS-Spektrum von [D₃]-CyEtVal-PFPTH in Toluol

m/z (%): 380 (56) [M], 365 (5) [M-CH₃], 352 (2) [M-CO], 338 (100) [M-C₃H₆], 319 (6), 310 (4) [M-CH₃-R], 283 (43) [M-C₃H₆-R], 263 (13), 225 (29) [C₆F₅NCS], 193 (16), 167 [C₆F₅] (10)

Abb. 4.3: EI/MS-Spektrum von MeVal-PFPTH in Toluol

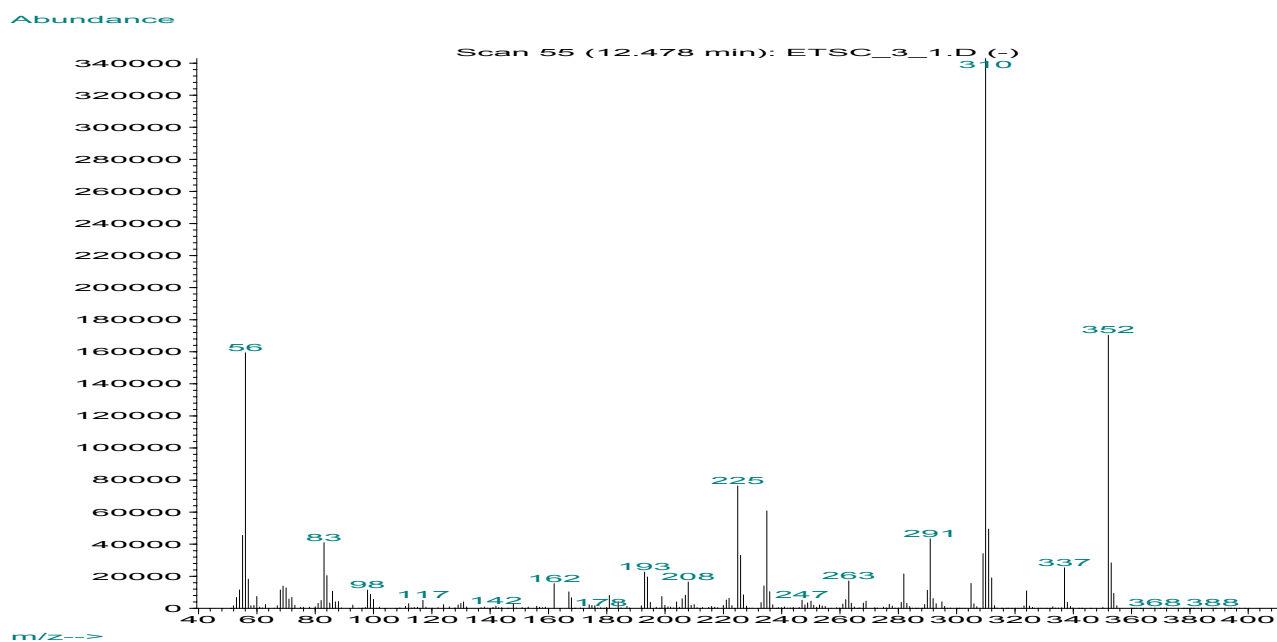


m/z (%): 338 (60) [M], 323 (1) [M-CH₃], 310 (5) [M-CO], 296 (100) [M-C₃H₆], 277 (33) [M-C₃H₆-R], 247 (13), 225 (10) [C₆F₅NCS], 193 (6), 167 [C₆F₅] (3)

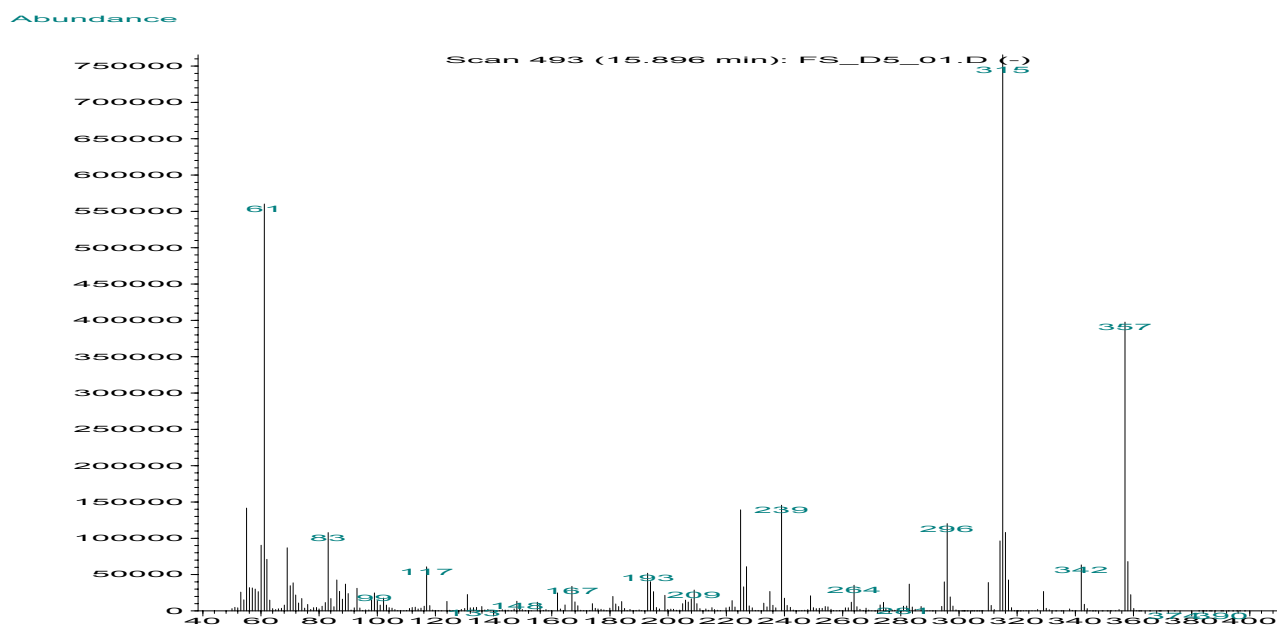
Abb. 4.4: EI/MS-Spektrum von [D₃]-MeVal-PFPTH in Toluol

m/z (%): 341 (66) [M], 326 (1) [M-CH₃], 313 (6) [M-CO], 299 (100) [M-C₃H₆], 280 (36) [M-C₃H₆-R], 249 (15), 225 (14) [C₆F₅NCS], 193 (6), 167 [C₆F₅] (4)

Abb. 4.5: EI/MS-Spektrum von EtVal-PFPTH in Toluol

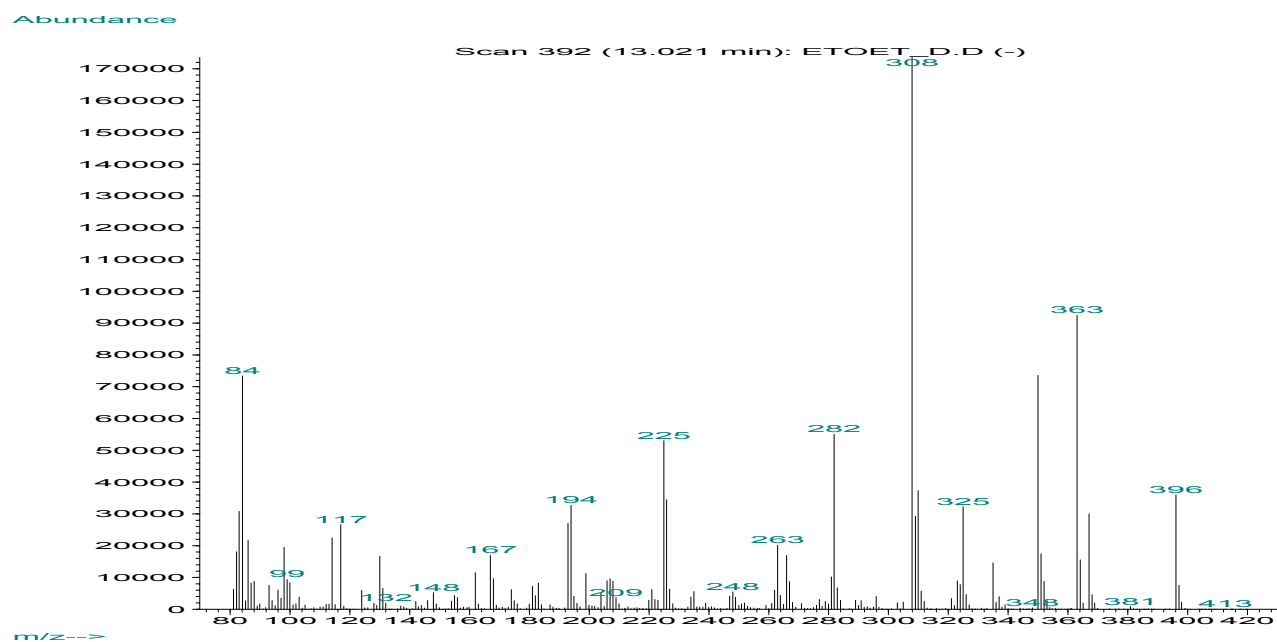


m/z (%): 352 (50) [M], 337 (7) [M-CH₃], 325 (3) [M-CO], 310 (100) [M-C₃H₆], 291 (13) [M-C₃H₆-R], 235 (18), 225 (22) [C₆F₅NCS], 193 (7), 167 [C₆F₅] (3)

Abb. 4.6: EI/MS-Spektrum von [D₅]-EtVal-PFPTH in Toluol

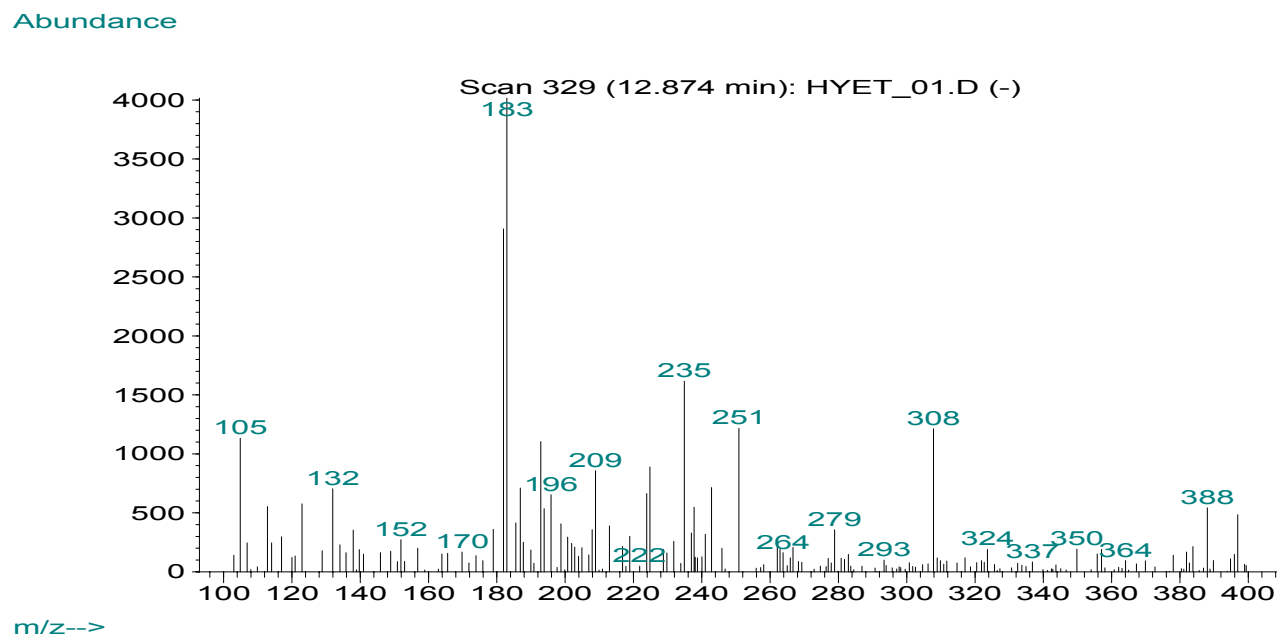
m/z (%): 357 (52) [M], 342 (8) [M-CH₃], 329 (3) [M-CO], 315 (100) [M-C₃H₆], 296 (16) [M-C₃H₆-R], 239 (19), 225 (18) [C₆F₅NCS], 193 (7), 167 [C₆F₅] (4)

Abb. 4.7: EI/MS-Spektrum von EtOEtVal-PFPTH in Toluol



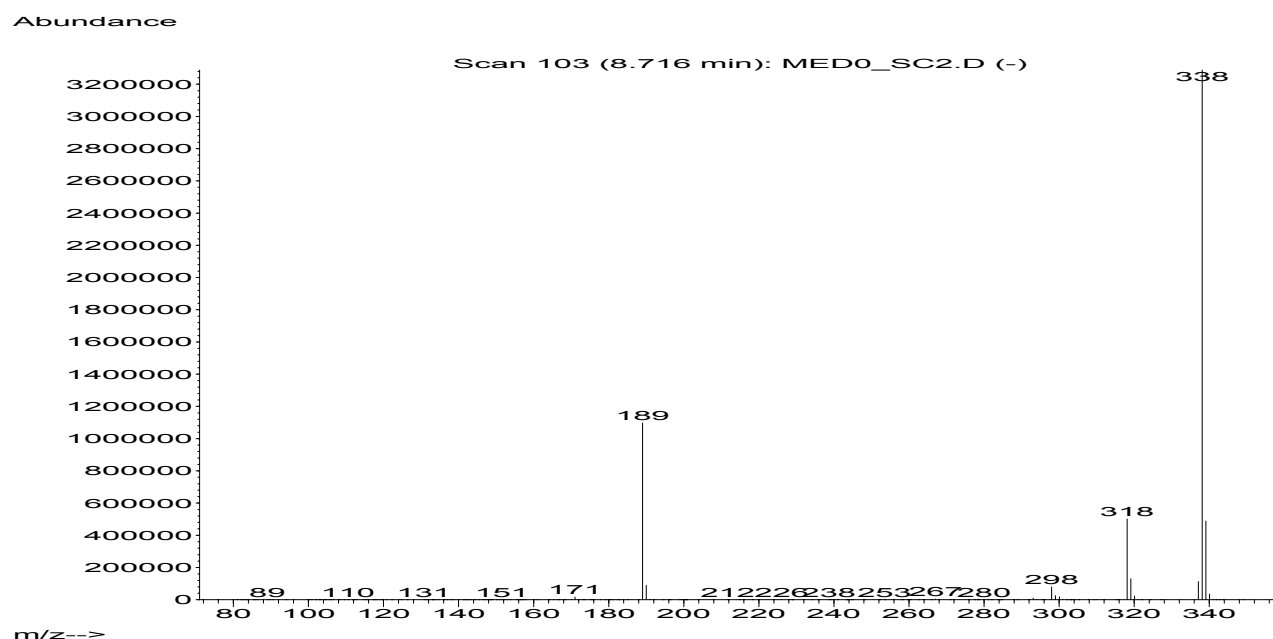
m/z (%): 396 (21) [M], 381 (3) [M-CH₃], 363 (55), 350 (43), 325 (18) [M-CO-C₃H₇], 308 (100), 282 (29) [M-C₃H₆-R], 263 (12), 225 (29) [C₆F₅NCS], 194 (18), 167 (9) [C₆F₅], 117 (13)

Abb. 4.8: EI/MS-Spektrum von HyEtVal-PFPTH in Toluol



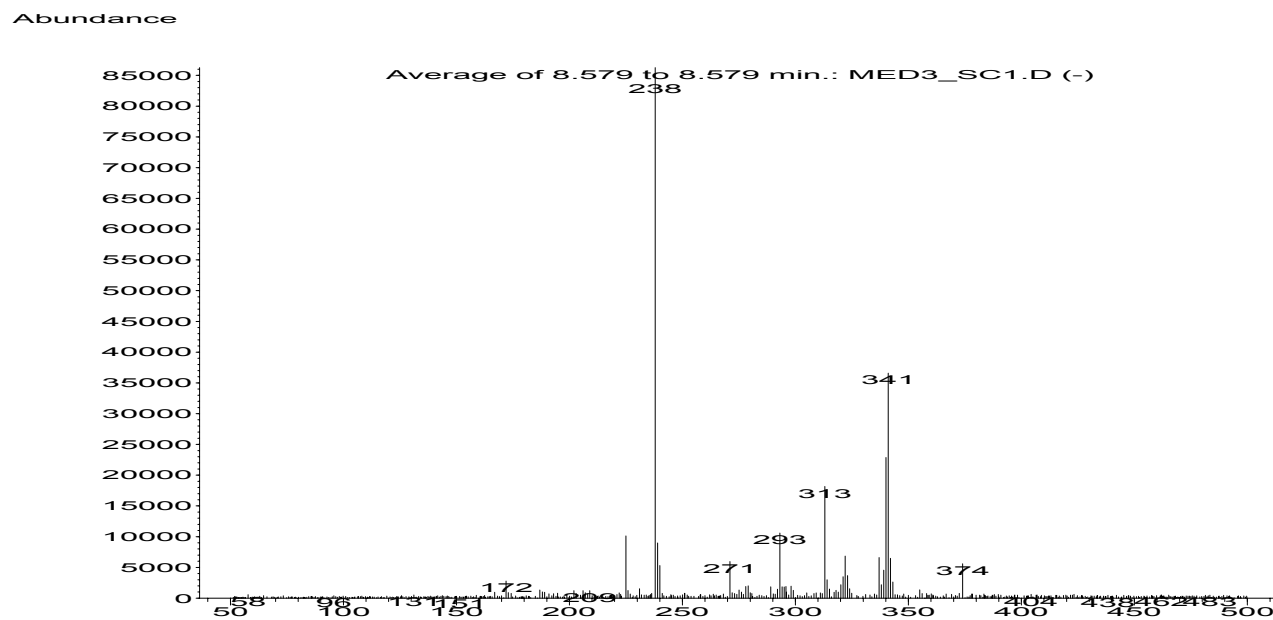
m/z (%): 350 (5) [M-H₂O], 308 (30) [M-H₂O-C₃H₆], 251 (30), 235 (40), 225 (22) [C₆F₅NCS], 183 (100), 182 (72)

Abb. 4.9: NICI/EC/MS-Spektrum von MeVal-PFPTH in Toluol



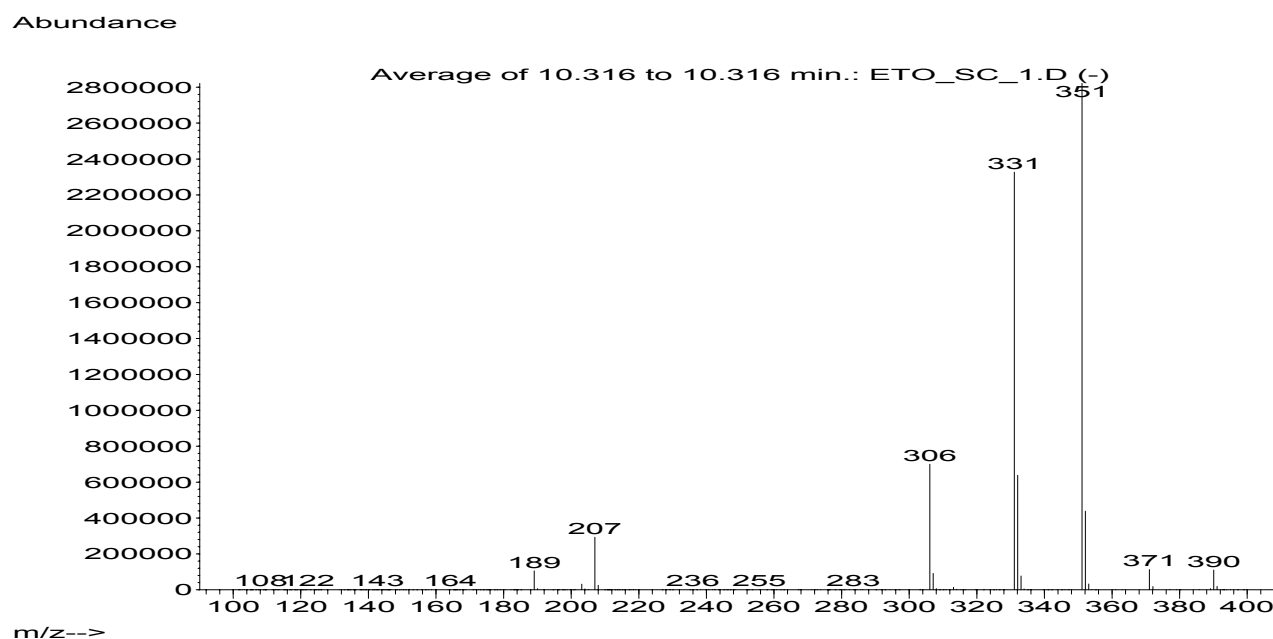
m/z (%): 338 (100) [M], 318 (15) [M-HF], 298 (2) [M-HF-HF], 189 (33) [C₆F₄-NC-CH₃]

Abb. 4.10: NICI/EC/MS-Spektrum von [D₃]-MeVal-PFPTH in Toluol

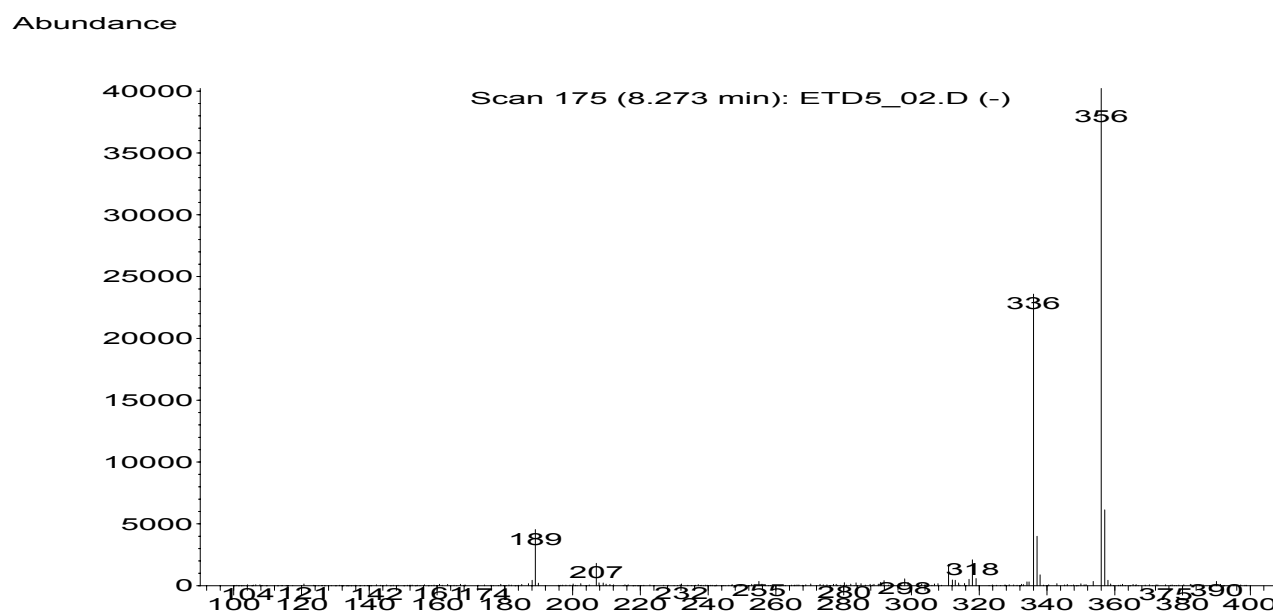


m/z (%): 341 (30) [M], 313 (17) [M-CO], 293 (10) [M-CO-HF], 238 (100) [M-CO-HF-C₄H₇], 225 (11) [C₆F₅NCS]

Abb. 4.11: NICI/EC/MS-Spektrum von EtVal-PFPTH in Toluol



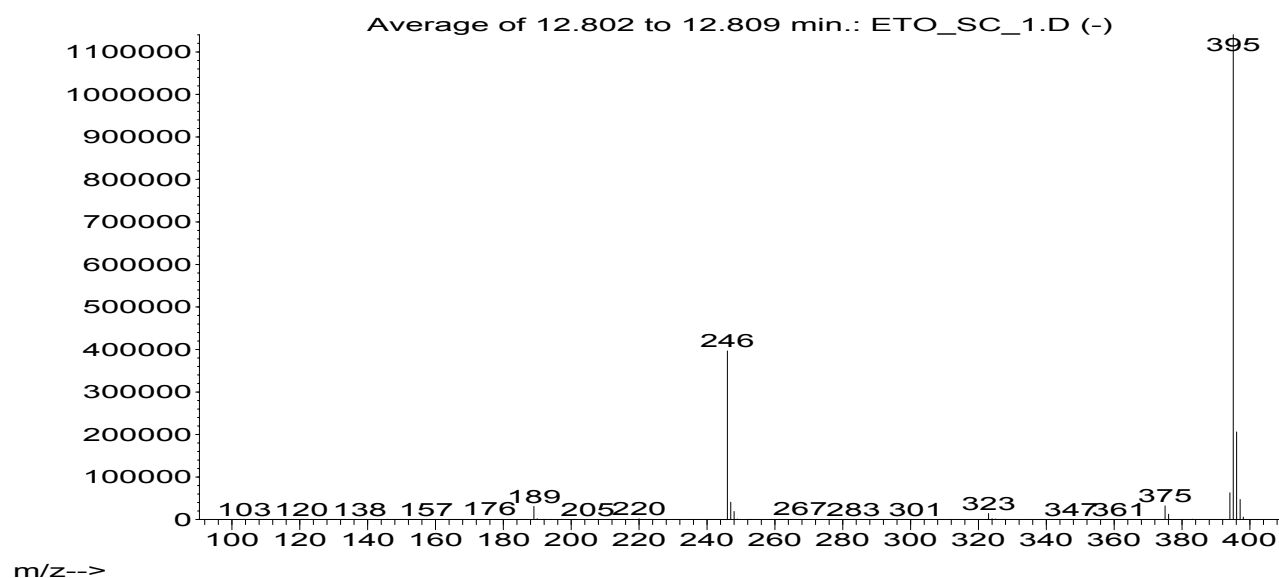
m/z (%): 351 (100) [M-H], 331 (97) [M-H-HF], 306 (30), 207 (15), 189 (5) [C₆F₄-NC-CH₃]

Abb. 4.12: NICI/EC/MS-Spektrum von [D₅]-EtVal-PFPTH in Toluol

m/z (%): 356 (100) [M-H], 336 (57) [M-H-HF], 318 (11) [M-H-HF-CD₃], 298 (2) [M-H-HF-CD₃-HF], 207 (3), 189 (9) [C₆F₄-NC-CH₃]

Abb. 4.13: NICI/EC/MS-Spektrum von EtOEtVal-PFPTH in Toluol

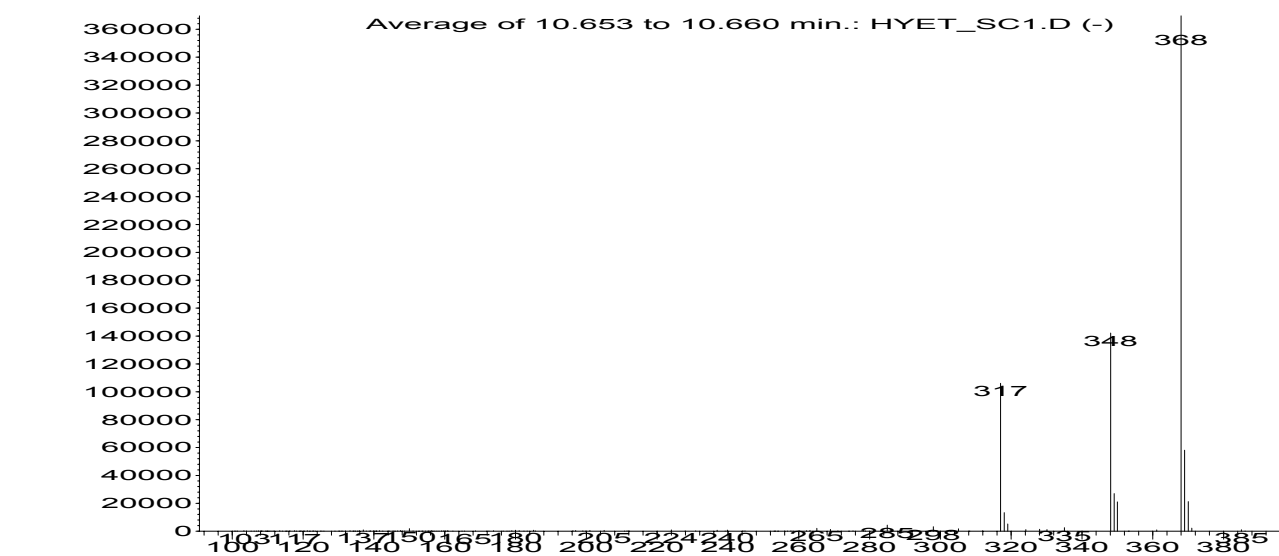
Abundance



m/z (%): 395 (100) [M-H], 377 (3) [M-F], 246 (29) [M-F-CS-NR]

Abb. 4.14: NICI/EC/MS-Spektrum von HyEtVal-PFPTH in Toluol

Abundance



m/z (%): 368 (100) [M], 348 (38) [M-HF], 317 (29) [M-H-HF-HCHO]

4.1.2.5.2 Peakweite und Retentionszeit

Während der Aufarbeitung der Studienproben ist als gerätespezifischer Parameter und als Retentionszeitmarker der deuterierte Hydantoin-Standard (DHS) gemessen worden. Der VK der Retentionszeit von 24 Messungen an 10 Tagen ist für keinen der Standards > 0,6 %. Die Variationskoeffizienten der Peakweiten liegen für alle Verbindungen unter 6 %. Damit sind die Kriterien hinsichtlich der Genauigkeit der Retentionszeiten erfüllt. Parallel dazu sind von 48 DHS-Proben die absoluten Flächeneinheiten des FPIH in eine Kontrollkarte eingetragen worden. Diese Messungen dienen der Überprüfung der Gerätespezifikation. Die Kontrollkarte ist im Anhang 8.2 (Abb. 8.1) gezeigt. Alle Werte liegen innerhalb der Spezifikationsgrenzen.

4.1.2.6 Robustheit

Als ein Kriterium der Robustheit für Methode 3.4.5.4.2 ist die Übereinstimmung in einem Laborvergleich herangezogen worden. Für das ABF wurde parallel die Laborpräzision ermittelt. Die erzielten Ergebnisse sind in Tab. 4.10 zusammengefasst.

Tab. 4.10: Laborvergleich der Methode 3.4.5.4.2 zur Ermittlung der Robustheit und Laborpräzision (Werte in µg/l Blut)

<i>Probe</i>	<i>Labor</i>	<i>MeVal</i>		<i>EtVal</i>		<i>HyEtVal</i>		<i>CyEtVal</i>	
		Wert 1/2	VK	Wert 1/2	VK	Wert 1/2	VK	Wert 1/2	VK
545	ABF	8,9 / 8,1	7,0 ^a	0,7 / 1,1	33,4 ^a	3,7 / 3,4	4,8 ^a	84,1 / 85,5	1,2 ^a
	Bayer	9,3	6,4 ^b	< 10	-	5,0	24,0 ^b	129,5	29,5 ^b
563	ABF	8,3 / 7,0	12,3 ^a	0,7 / 0,9	18,5 ^a	4,3 / 3,7	10,2 ^a	27,9 / 24,9	8,1 ^a
	Bayer	8,8	9,9 ^b	< 10	-	< 2	-	45,9	38,1 ^b
566	ABF	7,8 / 8,1	2,3 ^a	1,4 / 1,0	26,6 ^a	0,2 / 0,2	22,8 ^a	11,4 / 8,0	25,2 ^a
	Bayer	9,6	13,3 ^b	< 10	-	< 2	-	13,0	20,6 ^b
572	ABF	10,2 / 10,9	4,5 ^a	0,6 / 4,9	109,1 ^a	6,8 / 5,9	10,3 ^a	9,5 / 9,6	0,7 ^a
	Bayer	12,3	10,8 ^b	< 10	-	5,5	10,1 ^b	17,0	39,7 ^b
573	ABF	5,1 / 4,7	5,8 ^a	0,8 / 1,3	30,2 ^a	0,1 / 0,1	0,5 ^a	0,4 / 0,5	9,0 ^a
	Bayer	6,1	15,4 ^b	< 10	-	< 2	-	< 0,5	-
574	ABF	6,0 / 5,7	3,6 ^a	0,4 / 0,9	55,1 ^a	0,1 / 0,1	17,7 ^a	2,0 / 2,0	6,6 ^a
	Bayer	7,2	14,6 ^b	< 10	-	< 2	-	2,7	21,1 ^b

Fortsetzung Tab. 4.10:

<i>Probe</i>	<i>Labor</i>	<i>MeVal</i>		<i>EtVal</i>		<i>HyEtVal</i>		<i>CyEtVal</i>	
		Wert 1/2	VK ^a	Wert 1/2	VK	Wert 1/2	VK	Wert 1/2	VK
6/34	ABF	5,1	-	3,2	-	9,8	-	0,4	-
	Bayer	9,4	41,9 ^b	< 10	-	3,5	67,0 ^b	< 0,5	-
6/48	ABF	8,6	-	2,5	-	5,2	-	1,0	-
	Bayer	9,1	4,0 ^b	< 10	-	5,8	7,7 ^b	4,9	93,5 ^b
6/62	ABF	3,5	-	2,8	-	2,9	-	1,4	-
	Bayer	5,3	28,9 ^b	< 10	-	< 2	-	1,6	9,4 ^b
6/68	ABF	5,4	-	2,0	-	0,7	-	0,1	-
	Bayer	6,6	14,1 ^b	< 10	-	< 2	-	< 0,5	-
6/70	ABF	6,0	-	3,2	-	0,2	-	0,1	-
	Bayer	8,6	25,2 ^b	< 10	-	< 2	-	< 0,5	-
GP50	ABF	6,0	-	3,2	-	1,0	-	0,9	-
	Bayer	5,7	3,6 ^b	< 10	-	< 2	-	2,7	70,7 ^b

a: VK-Werte beziehen sich auf die Laborpräzision bei unabhängiger Aufarbeitung durch 2 Personen

b: VK-Werte beziehen sich auf den Vergleich der beiden Labormittelwerte (ABF/Bayer)

4.1.3 Anwendung der Methoden auf die Studie

Der Termin 6 der PAH Studie wurde mit beiden vorgestellten Methoden untersucht. Alle Proben wurden in 2 unabhängigen Ansätzen aufgearbeitet und jeweils doppelt vermessen. In Tab. 4.11 sind die Korrelationskoeffizienten der Doppelansätze für die einzelnen Analyten angegeben, die mit den Methoden 3.4.5.4.1 bzw. 3.4.5.4.2 erzielt werden.

Tab. 4.11: Korrelationskoeffizienten der Doppelbestimmungen

<i>Analyt (Aufarbeitung 1 vs. 2)^a</i>	<i>Methode</i>	<i>Methode</i>	<i>Methoden</i>
	<i>Mit SPE</i>	<i>LLE</i>	<i>untereinander</i>
MeVal	0,941***	0,75**	0,817***
EtVal	0,893***	0,06	- 0,10
HyEtVal	-	0,84**	-
CyEtVal	0,956***	0,90***	0,882***

a: *: Korrelation ist auf dem Niveau von p = 0,05 signifikant; **: Korrelation ist auf dem Niveau von p = 0,01 signifikant;

***: Korrelation ist auf dem Niveau von p < 0,001 signifikant

In Tabelle 4.12 sind die ermittelten Werte der beiden Methoden für die einzelnen Addukte zusammengefasst und in Abb. 4.15 graphisch aufgetragen.

Tab. 4.12: Ergebnisse der Studie, eingeteilt in Nichtraucher, Passivraucher und Raucher; Werte in pmol/g Globin

<i>Status</i>	<i>Parameter</i>	<i>MeVal</i>		<i>EtVal</i>		<i>HyEtVal</i>		<i>CyEtVal</i>	
		SPE	LLE	SPE	LLE	SPE	LLE	SPE	LLE
Nichtraucher (N = 19)	MW	337,1	254,9	45,8	120,0	-	78,3	32,9	4,5
	Median	341,7	262,8	39,2	111,5	-	25,1	29,3	2,5
	STABW	56,1	33,4	27,1	27,8	-	112,5	23,3	4,3
	SE	11,7	7,1	5,9	5,9	-	24,0	5,7	0,9
	Minimum	182,9	185,0	19,2	85,7	-	3,8	11,4	n.n.
	Maximum	440,2	307,8	120,1	203,7	-	385,7	117,4	13,6
Passivraucher (N = 23)	MW	365,9	259,0	39,8	106,5	-	44,3	54,4	4,7
	Median	360,8	245,9	37,9	104,0	-	27,1	25,4	2,5
	STABW	57,3	38,2	20,2	24,9	-	45,3	63,2	6,4
	SE	13,2	8,8	4,6	5,7	-	10,4	15,8	1,5
	Minimum	263,4	213,1	11,5	60,7	-	4,4	12,2	n.n.
	Maximum	468,1	358,6	98,1	152,7	-	150,5	233,8	24,6
Raucher (N = 27)	MW	490,2*	362,5*	45,2	111,4	-	185,4*	197,3*	61,9*
	Median	455,1	348,5	40,8	109,7	-	152,4	187,2	59,4
	STABW	149,0	135,4	19,9	31,7	-	153,4	97,6	38,3
	SE	28,7	26,1	3,8	6,1	-	29,4	18,8	7,4
	Minimum	322,4	169,7	21,1	58,9	-	5,2	63,6	7,1
	Maximum	986,0	710,8	99,6	190,5	-	627,2	371,7	133,5

*: MW und Median der Rauchergruppe zeigen signifikante Unterschiede zur Gruppe der Nichtraucher

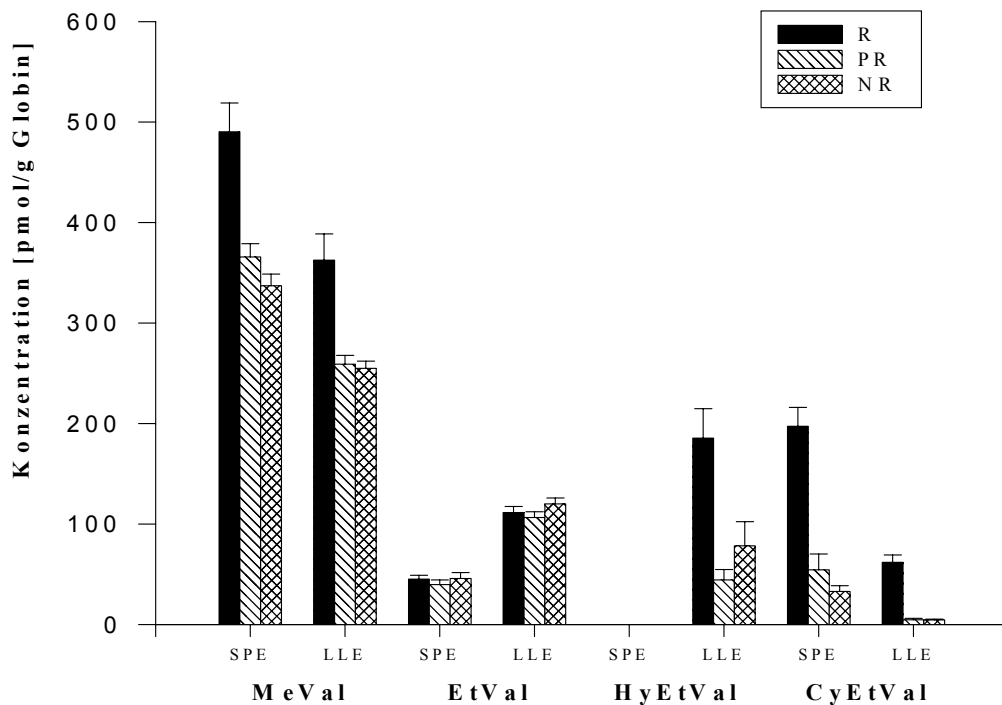


Abb. 4.15: Hb-Adduktlevel der PAH-Studie: Vergleich SPE vs. LLE (MW \pm SE)

In Abb. 4.16 sind für MeVal die Methoden gegenübergestellt. Man erkennt, dass für Raucher, Passiv- und Nichtraucher die Messwerte signifikant unterschiedlich sind. Die Ergebnisse der Messungen mit SPE liegen bei allen Gruppen höher als nur mit Flüssig-/Flüssigextraktion. Die Endpunkte der Balken nach unten und oben stellen die 5. und 95. Percentile dar. Innerhalb des Kastens liegen 80 % aller Werte. Ebenfalls deutlich zu erkennen ist, dass für die Gruppe der Nichtraucher und für die Gruppe der Passivraucher mit keiner der beiden Methoden signifikant unterschiedliche Werte gemessen werden. Für die MeVal-Addukte bedeutet dies, dass ein Einfluss des Passivrauchens nicht festgestellt werden kann. Für die weitere Auswertung (4.5) werden die Nicht- und Passivraucher daher zu einer Gruppe zusammengefasst.

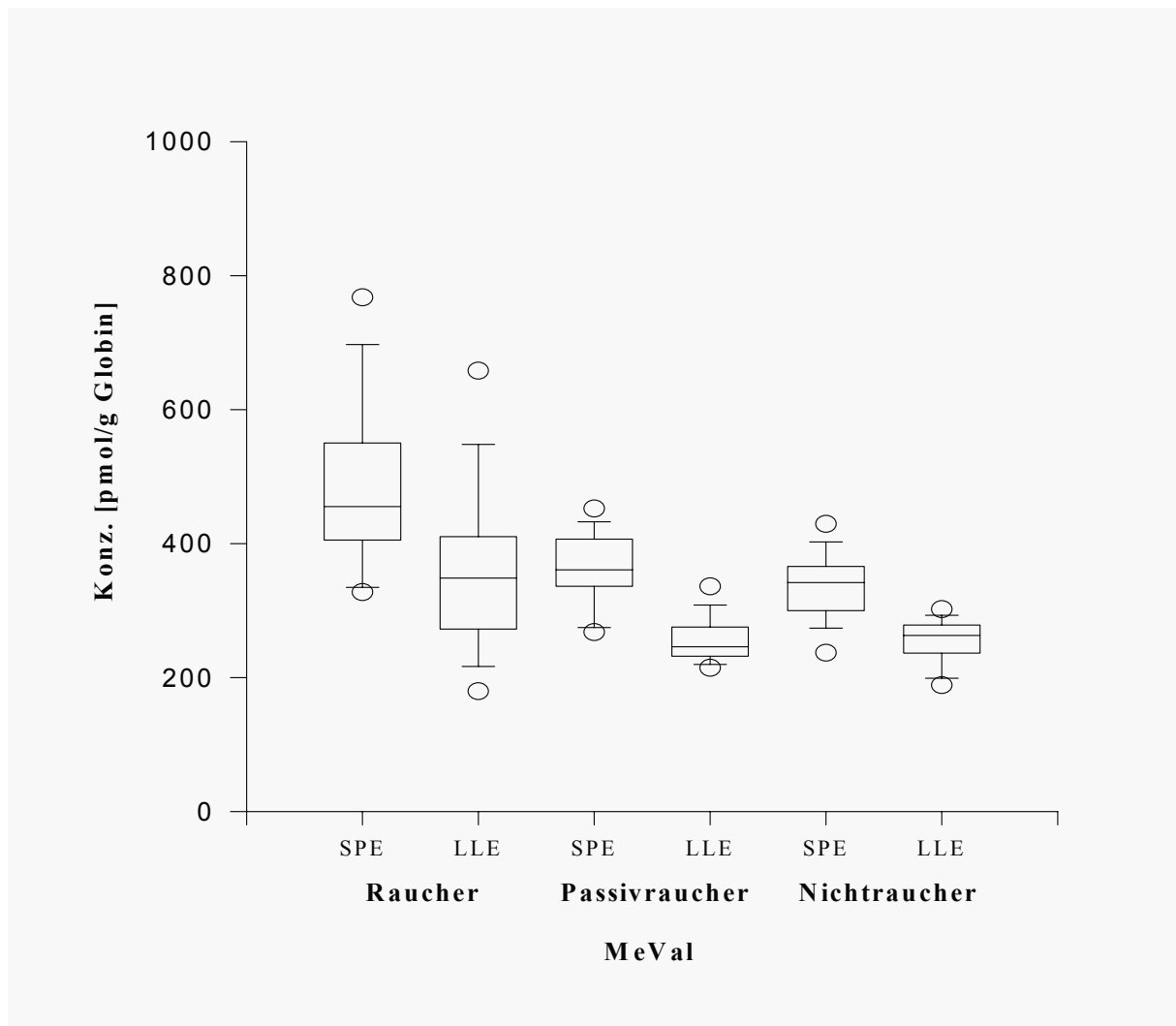


Abb. 4.16: MeVal-Addukte Methodenvergleich

Für EtVal (Abb. 4.17) ergibt sich ein anderes Bild. Zwar unterscheiden sich auch hier die Messungen der beiden Methoden signifikant voneinander, es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Messungen mit der LLE-Methode nicht selektiv genug sind und deshalb Matrixkomponenten als Peak mit ausgewertet werden. Deshalb liegen die Messwerte deutlich über denen der SPE-Methode, sind jedoch als nicht aussagekräftig einzustufen. Bei diesem Addukt ergeben sich mit keiner der beiden Methoden signifikante Unterschiede zwischen Rauchern, Nicht- und Passivrauchern. Auch in diesem Falle wird für die weitere Auswertung (4.5) eine gemeinsame Nichtrauchergruppe, mit und ohne ETS-Exposition, gebildet.

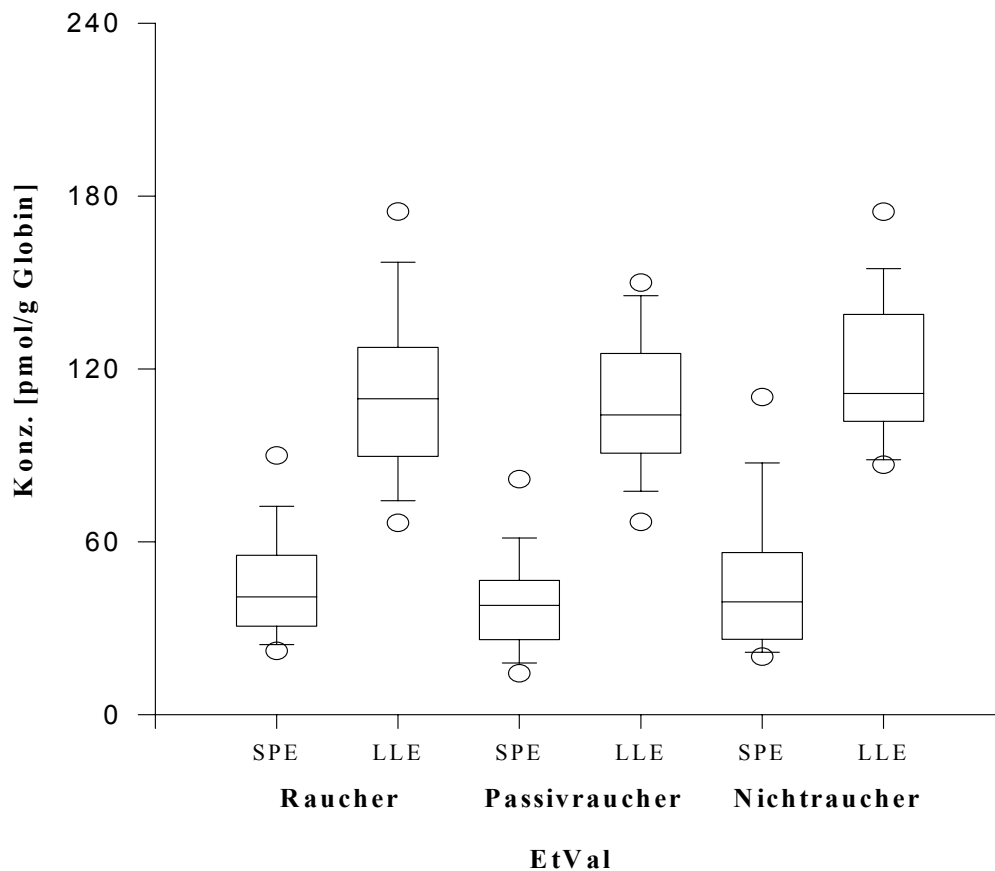


Abb. 4.17: EtVal-Addukte Methodenvergleich

In Abb. 4.18 sind die entsprechenden Ergebnisse für CyEtVal dargestellt. Sehr gut zu erkennen sind die hoch signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern einerseits und den belasteten und nicht-belasteten Nichtrauchern andererseits, unabhängig mit welcher Methode gemessen wird. Für alle drei Gruppen werden mit der SPE-Methode höhere Werte erzielt als mit der LLE-Methode.

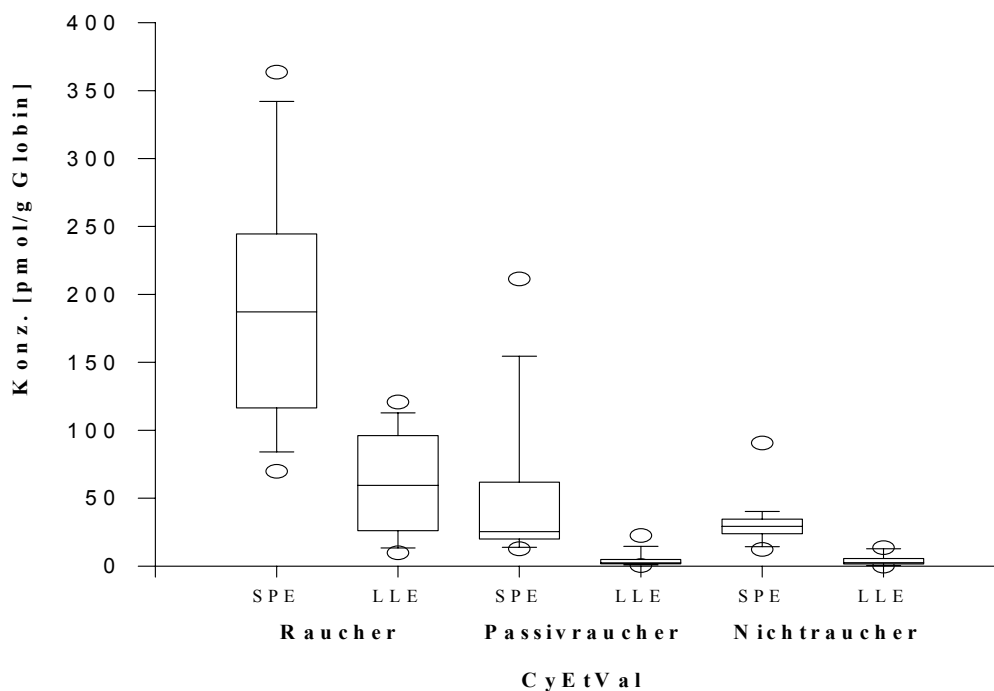


Abb. 4.18: CyEtVal-Addukte Methodenvergleich

Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Nicht- und Passivrauchern feststellen, so dass auch in diesem Fall für die weitere Auswertung zwischen den beiden Gruppen nicht mehr unterschieden wird. In den Abb. 4.19 bis 4.21 sind typische Chromatogramme abgebildet, wie sie mit den beiden Methoden erhalten werden. Jede Ionenspur, auf die ausgewertet wird, ist einzeln gezeigt. Die Stufen im Chromatogramm entstehen durch Umschalten der Elektronik des Massenspektrometers und durch das unterschiedliche Hintergrundrauschen der einzelnen Ionenspuren. Gezeigt wird jeweils eine Raucherprobe (PAH 67), wobei auf die Darstellung des EtOEtVal bei Abb. 4.19 (Methode 3.4.5.4.1) verzichtet wird. Man erkennt, dass im Chromatogramm nach Methode 3.4.5.4.2 für EtVal kein Peak eindeutig zuzuordnen ist, weil nicht geklärt werden kann, welcher der beiden unmittelbar nacheinander eluierenden Peaks der eigentliche Analytpeak ist. In dem Falle wurde der vordere Peak ausgewertet. Durch Methode 3.4.5.4.1 gelingt es zumindest, den störenden Matrixpeak zu entfernen und so EtVal zweifelsfrei zuordnen zu können. Gleichzeitig wird das Grundrauschen so weit abgesenkt, dass trotz der geringeren absoluten Intensität selbst Nichtraucherproben noch ausgewertet werden können. Zur besseren Übersichtlichkeit ist das Ionenchromatogramm des EtVal und des deuterierten Standards nach Festphasenextraktion in Abb. 4.21 vergrößert dargestellt.

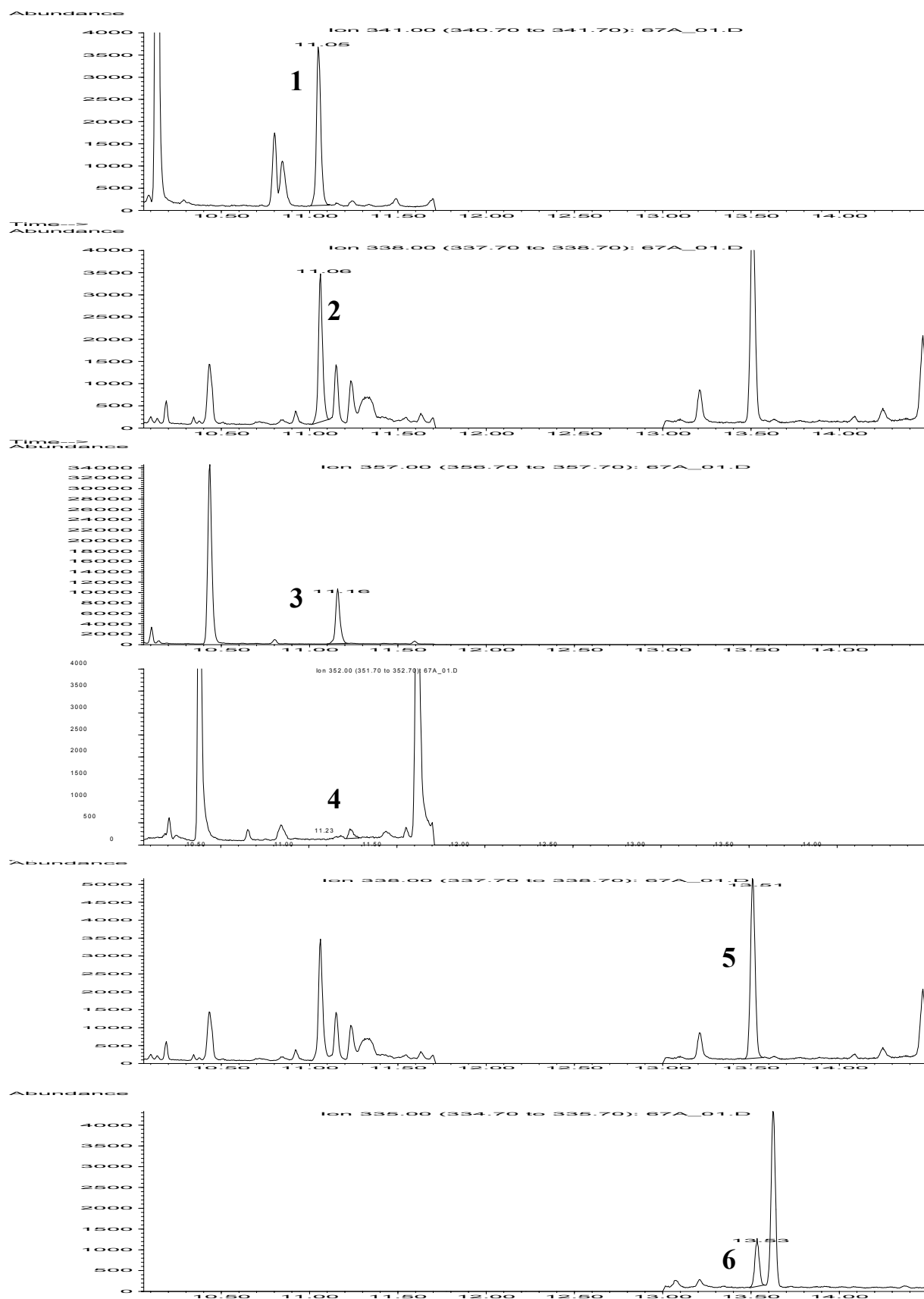


Abb. 4.19: Chromatogramm einer Raucherprobe (PAH 67) nach SPE; die Peaks sind nummeriert: 1: [D₃]-MeVal 2: MeVal 3: [D₅]-EtVal
4: EtVal 5: [D₃]-CyEtVal 6: CyEtVal

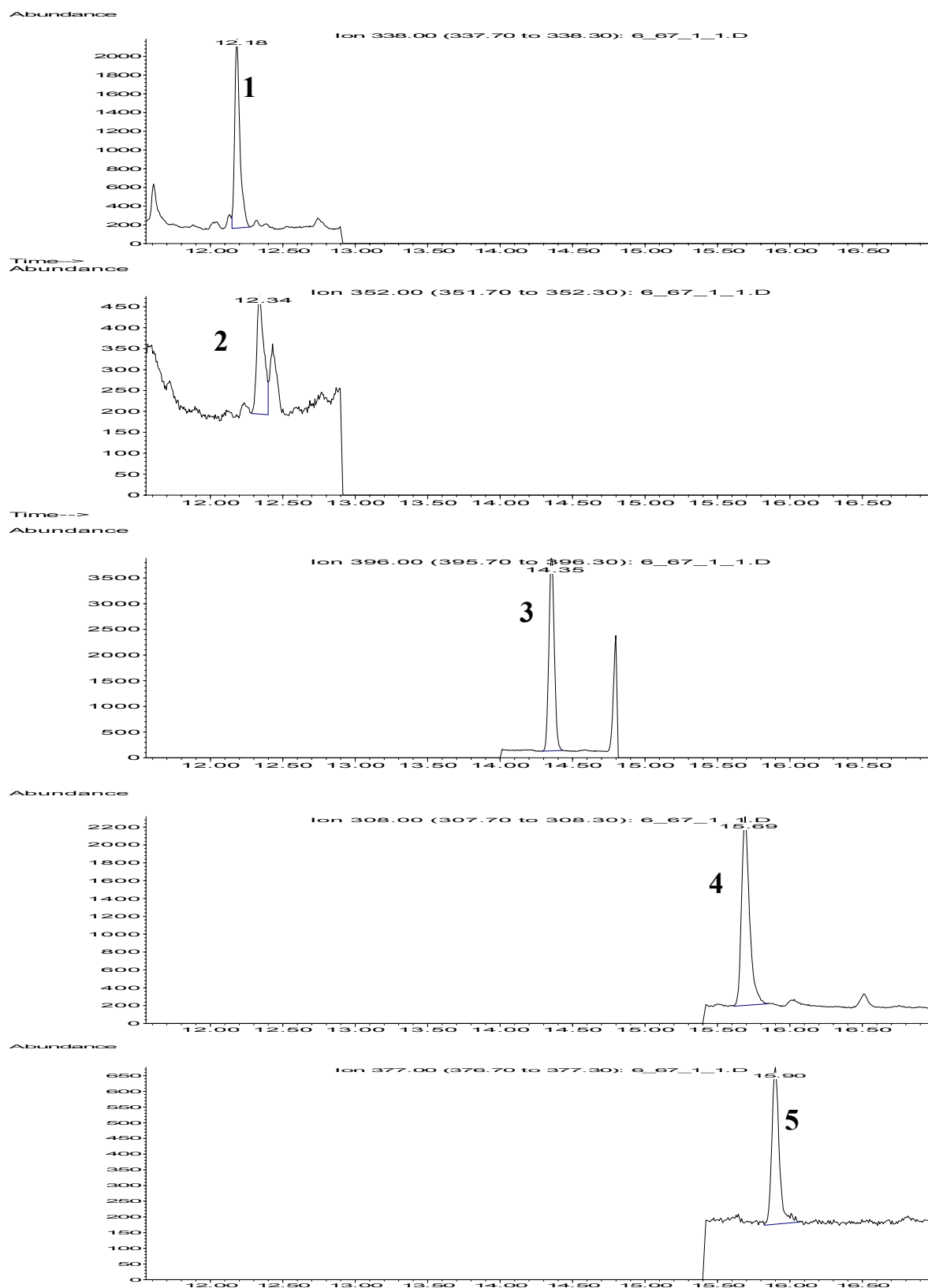


Abb. 4.20: Chromatogramm einer Raucherprobe (PAH 67) nach LLE; die Peaks sind nummeriert: 1: MeVal, 2: EtVal, 3: EtOEtVal, 4: HyEtVal 5: CyEtVal

Abundance

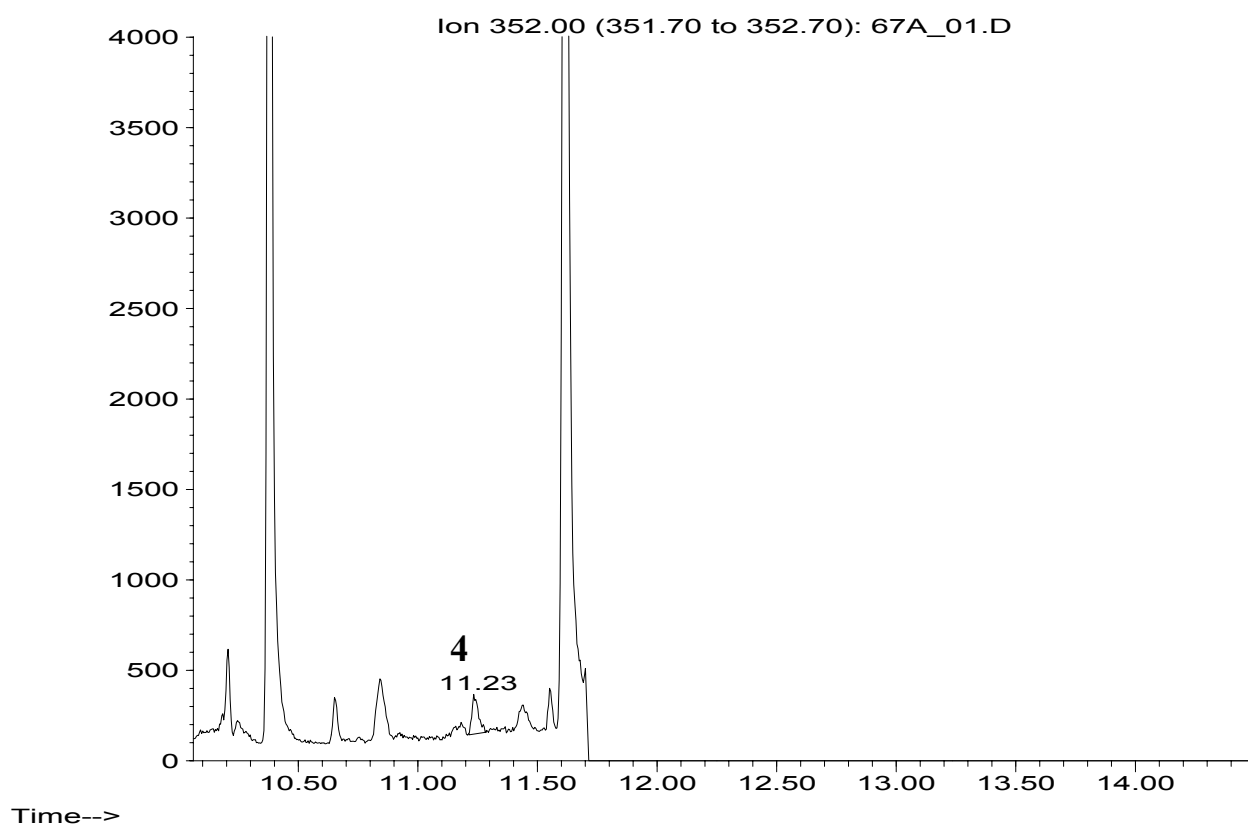
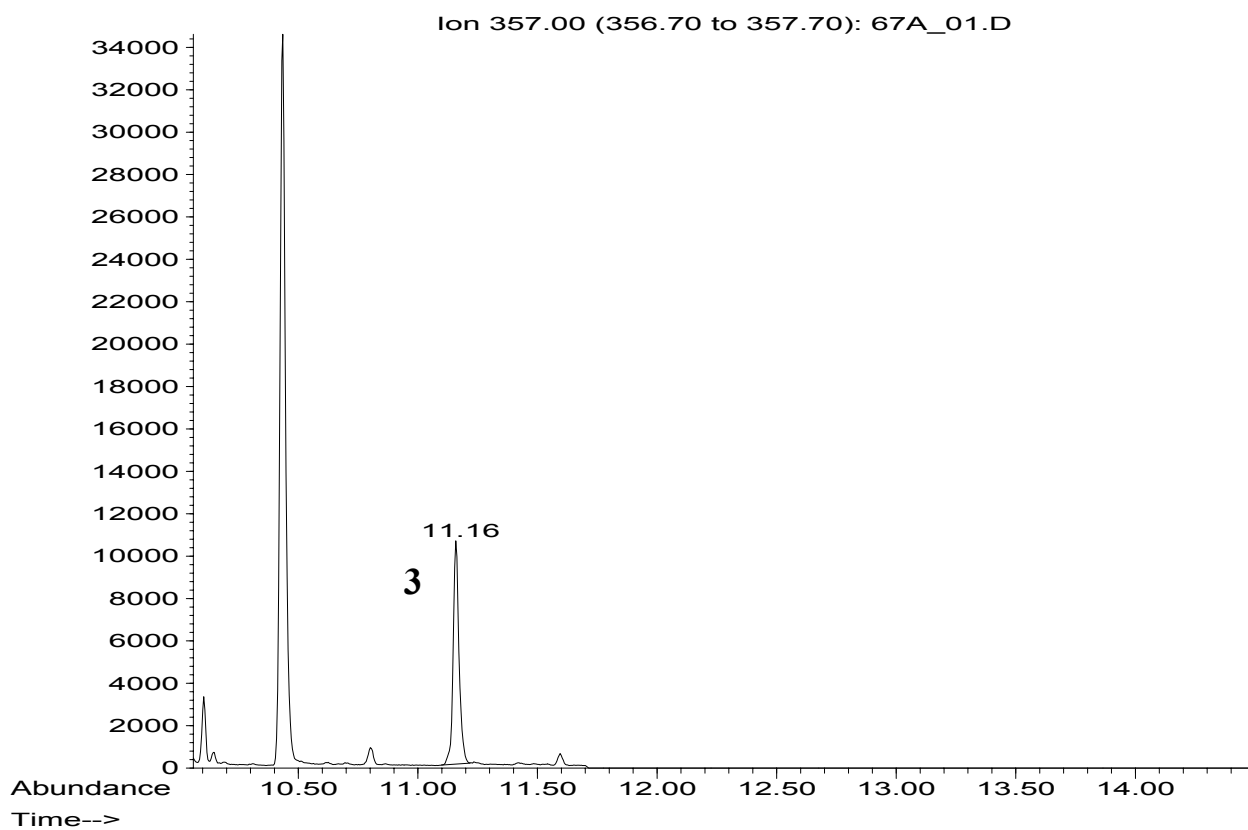


Abb. 4.21: Ionenchromatogramm von $[D_5]$ -EtVal (3) und EtVal (4) nach SPE; das Grundrauschen von < 100 FE ermöglicht die Identifizierung der Peaks

4.2 Mercaptursäuren

4.2.1 Validierung der Methode

4.2.1.1 Präzision

Die Ergebnisse der Methodenpräzision in der Serie (intra-day) sowie von Tag zu Tag (inter-day) sind in der Tabelle 4.13 zusammengefasst.

Tab. 4.13: Präzision und Wiederholbarkeit der Methode

<i>Pool (N = 6)</i>	<i>MMA</i> [ng/ml]	<i>EMA</i> [ng/ml]	<i>HPMA</i> [ng/ml]	<i>CEMA</i> [ng/ml]	<i>HEMA</i> [ng/ml]
Pool Leerwert MW	45,4	9,9	142,1	1007,5	-
Pool Leerwert STABW	7,5	8,3	5,9	46,3	-
VK	16,5	84,6	4,2	4,6	-
Intra-day, N=10/Tag					
Pool dotiert I MW	645,0	571,0	224,7	1203,0	-
Pool dotiert I STABW	25,2	30,5	10,6	62,1	-
VK	3,9	5,3	4,7	5,2	-
Intra-day, N=10/Tag					
Pool dotiert II MW	1237,6	1237,9	291,7	1509,0	-
Pool dotiert II STABW	37,5	37,4	9,7	72,2	-
VK	3,0	3,0	3,3	4,8	-
Intra-day, N=16/Tag					
Pool dotiert III MW	2492,6	2476,7	453,2	2222,2	-
Pool dotiert III STABW	119,7	101,3	22,4	206,5	-
VK	4,8	4,1	4,9	9,3	-
Inter-day, N=10 an 8 Tagen					
Pool dotiert III MW	2585,7	2531,6	468,9	2234,6	-
Pool dotiert III STABW	161,3	78,3	43,5	271,8	-
VK	6,2	3,1	9,3	12,2	-

Die Genauigkeit der Methode wird durch Messung je einer Raucher-, Nichtraucher- und Passivraucherprobe weiter überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.14 angegeben.

Tab. 4.14: Genauigkeit der Methode (Raucher-, Nichtraucher- und Passivraucherprobe)

	<i>MMA</i> [ng/ml]	<i>EMA</i> [ng/ml]	<i>HPMA</i> [ng/ml]	<i>CEMA</i> [ng/ml]	<i>HEMA</i> [ng/ml]
Raucher (N=10)					
MW	52,3	3,0	2807,4	1620,8	-
STABW	8,2	1,4	538,2	92,5	-
VK	15,7	47,2	19,2	5,7	-
Nichtraucher (N=10)					
MW	47,6	3,5	593,8	1283,0	-
STABW	5,0	1,0	57,1	95,1	-
VK	10,4	29,4	9,6	7,4	-
Passivraucher (N=10)					
MW	107,6	95,4	1632,4	3403,7	-
STABW	5,4	13,1	93,6	108,1	-
VK	5,0	13,7	5,7	3,2	-

Bei jedem Aufarbeitungszyklus der Studienproben wird zusätzlich eine Poolprobe mitbestimmt. Die damit erzielten Werte sind in Tab. 4.15 zusammengefasst.

Tab. 4.15: 19 Poolproben während der Aufarbeitungszyklen

<i>Pool (N=19)</i>	<i>MMA</i> [ng/ml]	<i>EMA</i> [ng/ml]	<i>HPMA</i> [ng/ml]	<i>CEMA</i> [ng/ml]	<i>HEMA</i> [ng/ml]
MW	40.44	7.26	140.19	923.14	200.34
STABW	4.12	2.61	13.28	108.66	27.98
VK	10.18	35.91	9.47	11.77	13.97

4.2.1.2 Wiederfindungsrate

4.2.1.2.1 Absolute Wiederfindungsrate

Die absolute Wiederfindungsrate über das Gesamtverfahren kann nicht bestimmt werden, da keine analytfreie Matrix zur Verfügung steht. Daher wird mit Dotierexperimenten eine relative Wiederfindungsrate bestimmt (4.2.1.2.2).

4.2.1.2.2 Relative Wiederfindungsrate

Die Ergebnisse und die Wiederfindungsraten sind in den Tabellen 4.16 – 4.19 angegeben.

Tab. 4.16: Grundlevel an Mercaptursäuren in Poolproben (N=6)

<i>Pool (N = 6)</i>	<i>MMA</i>	<i>EMA</i>	<i>HPMA</i>	<i>CEMA</i>	<i>HEMA</i>
	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]
Pool Leerwert MW	45,4	9,9	142,1	1007,5	-
Pool Leerwert STABW	7,5	8,3	5,9	46,3	-
VK	16,5	84,6	4,2	4,6	-

Der Konzentrationsbereich 1 umfasst eine Dotierung der Poolproben mit 625 ng/ml (MMA, EMA), 88,125 ng/ml (HPMA) und 312,5 ng/ml (CEMA).

Tab. 4.17: 10 Poolproben dotiert im Konzentrationsbereich 1

<i>Pool (N = 10)</i>	<i>MMA</i>	<i>EMA</i>	<i>HPMA</i>	<i>CEMA</i>	<i>HEMA</i>
	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]
Pool Leerwert MW	45,4	9,9	142,1	1007,5	-
Pool dotiert Sollwert	670,4	634,9	230,2	1320,0	-
MW gefunden	645,0	571,0	224,7	1203,0	-
Höchster Wert	702,6	634,7	241,0	1323,1	-
Tiefster Wert	618,7	510,6	214,5	1115,6	-
rel. WFR [%]	94 – 105	80 – 100	92 – 106	85 - 100	-

Der Konzentrationsbereich 2 umfasst eine Dotierung der Poolproben mit 1250 ng/ml (MMA, EMA), 166,25 ng/ml (HPMA) und 625 ng/ml (CEMA).

Tab. 4.18: 10 Poolproben dotiert im Konzentrationsbereich 2

<i>Pool (N = 10)</i>	<i>MMA</i>	<i>EMA</i>	<i>HPMA</i>	<i>CEMA</i>	<i>HEMA</i>
	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]
Pool Leerwert MW	45,4	9,9	142,1	1007,5	-
Pool dotiert Sollwert	1295,4	1259,9	308,4	1632,5	-
MW gefunden	1237,6	1237,9	291,7	1509,0	-
Höchster Wert	1284,4	1287,6	309,3	1654,3	-
Tiefster Wert	1160,1	1166,3	276,5	1374,1	-
rel. WFR [%]	90 – 99	93 – 102	91 – 102	84 – 101	-

Der Konzentrationsbereich 3 umfasst eine Dotierung der Poolproben mit 2500 ng/ml (MMA, EMA), 332,5 ng/ml (HPMA) und 1250 ng/ml (CEMA).

Tab. 4.19: 16 Poolproben dotiert im Konzentrationsbereich 3

<i>Pool (N = 16)</i>	<i>MMA</i>	<i>EMA</i>	<i>HPMA</i>	<i>CEMA</i>	<i>HEMA</i>
	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]
Pool Leerwert MW	45,4	9,9	142,1	1007,5	-
Pool dotiert Sollwert	2545,4	2509,9	474,6	2257,5	-
MW gefunden	2492,6	2476,7	453,2	2222,2	-
Höchster Wert	2813,1	2601,5	485,7	2353,5	-
Tiefster Wert	2341,3	2329,7	452,9	2116,8	-
rel. WFR [%]	92 – 111	93 – 104	95 – 105	94 – 102	-

4.2.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

In Tab. 4.20 sind die Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BSG) für die neuentwickelte Methode über das Gesamtverfahren angegeben.

Tab. 4.20: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Mercaptursäuren

<i>Analyt</i>	<i>Verfahren</i>	<i>NWG</i>	<i>BSG</i>
		[ng/ml]	[ng/ml]
MMA	Leerwert	13,6	41,2
	Signal/Rauschen	5,6	16,9
EMA	Leerwert	11,2	26,1
	Signal/Rauschen	3,3	9,9
HPMA	Leerwert	19,5	59,0
	Signal/Rauschen	10,9	32,7
CEMA	Leerwert	357,9	1086,6
	Signal/Rauschen	19,9	59,8
HEMA	Leerwert	92,3	279,3
	Signal/Rauschen	20,3	60,9

4.2.1.4 Linearität

Die Methode zeigt im Bereich von 6 bis 6000 ng/ml Urin für alle Analyten ein lineares Verhalten. Tab 4.21 zeigt die ermittelten Korrelationskoeffizienten und den daraus ermittelten linearen Bereich.

Tab. 4.21: Geradengleichung und Korrelationskoeffizienten der Analyten bezogen auf den internen Standard iPrMA

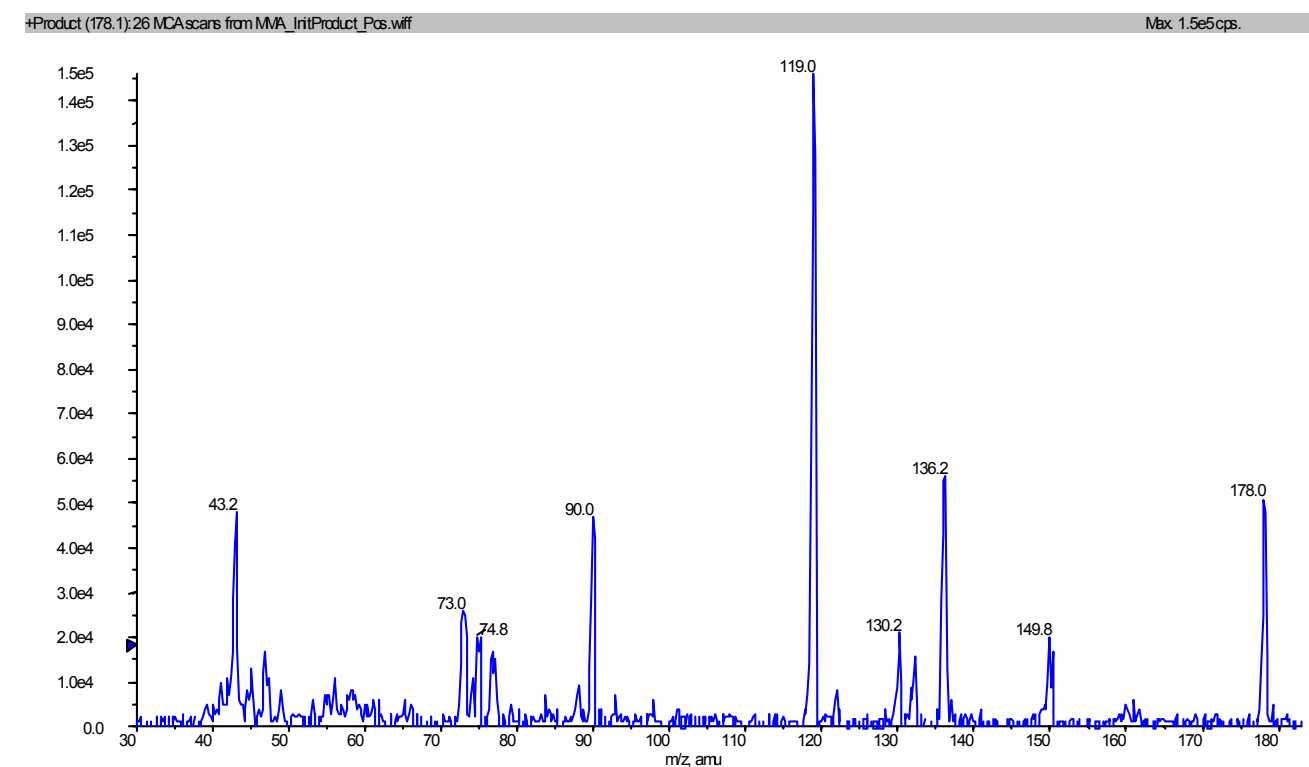
<i>Analyt</i>	<i>Geradengleichung</i>	<i>Korr.-Koeffizient</i>
MMA	$y = 1,0563 x + 0,0022$	$R^2 = 0,9990$
EMA	$y = 4,9017 x + 0,0134$	$R^2 = 0,9996$
HPMA	$y = 0,9527 x + 0,0026$	$R^2 = 0,9997$
CEMA	$y = 0,2976 x + 0,0143$	$R^2 = 0,9866$
HEMA	$y = 0,0020 x + 0,0151$	$R^2 = 0,9988$

4.2.1.5 Selektivität

4.2.1.5.1 Charakterisierung der Analyten und des internen Standards durch Fullscan-Massenspektren

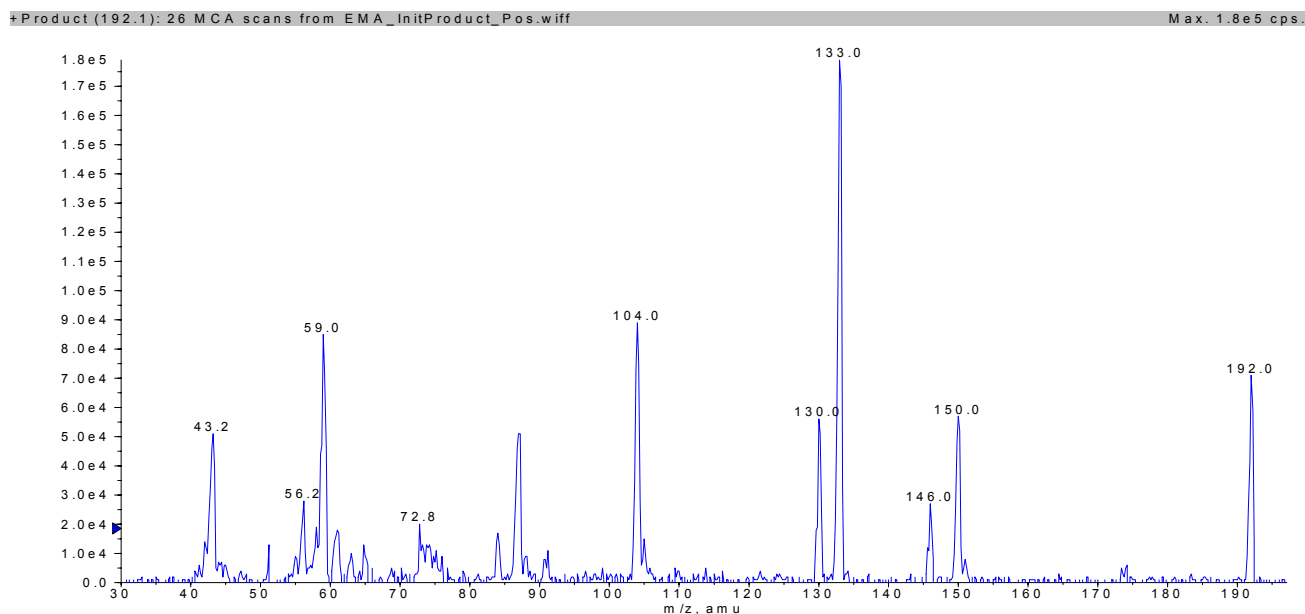
In den Abbildungen 4.22 bis 4.27 sind die LC-MS-Fullscan-Massenspektren der Mercaptursäuren gezeigt. Im Gegensatz zu den GC/MS-Spektren werden bei der Infusion der Analyten über die Spritzenpumpe mehrere Scans aufsummiert. Dadurch nehmen die absoluten Intensitäten zu und die Signale erscheinen breiter.

Abb. 4.22: Fullscan-Spektrum von MMA



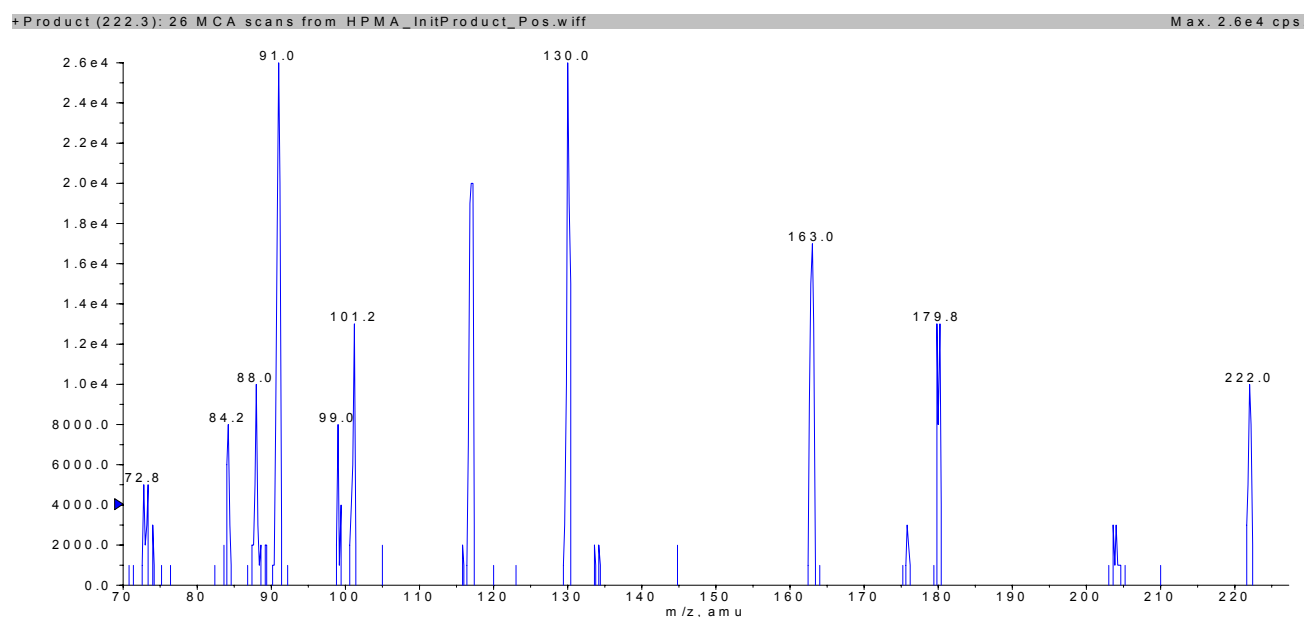
m/z (%): 178 (35) [M+H], 136 (38) [M+H]-[CH₂CO], 132 (11), [M+H]-[HCOOH], 130 (14) [M+H]-[CH₃SH], 119 (100) [M+H]-[CH₃CONH₂], 90 (32) [M+H]-[CH₃CO-HCOOH], 75 (14) [M+H]-[CH₃CONH₂-CO₂], 73 (18) [M+H]-[CH₃CONH₂-HCOOH], 47 (12) [M+H]-[CH₃CONH₂-HCOOH-C₂H₂], 43 (12) [M+H]-[CH₃SCH₂CH(NH)COOH]

Abb. 4.23: Fullscan-Spektrum von EMA



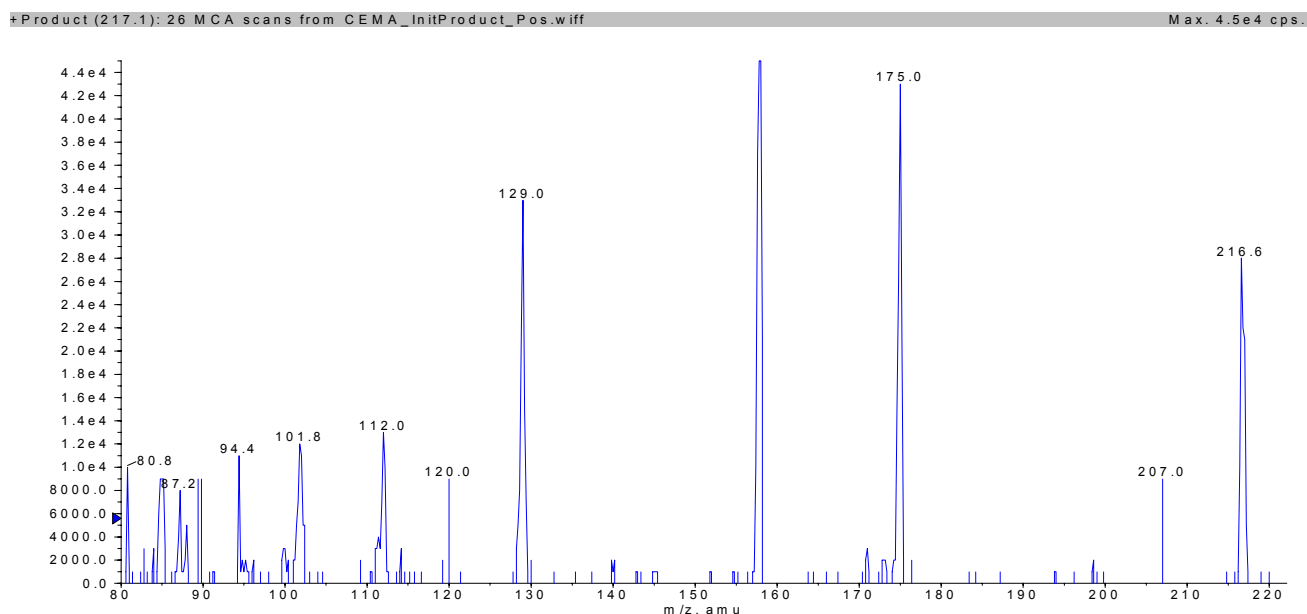
m/z (%): 192 (40) [M+H], 150 (32) [M+H]-[CH₂CO], 146 (15) [M+H]-[HCOOH], 133 (100) [M+H]-[CH₃CONH₂], 130 (31) [M+H]-[C₂H₅SH], 104 (50) [M+H]-[CH₂CO-HCOOH], 87 (28) [M+H]-[CH₃CONH₂-HCOOH], 61 (10) [M+H]-[CH₃CONH₂-HCOOH-C₂H₂], 59 (47) [M+H]-[C₂H₅SCH₂CH(CH)COOH], 43 (28) [M+H]-[C₂H₅SCH₂CH(NH)COOH]

Abb. 4.24: Fullscan-Spektrum von HPMa



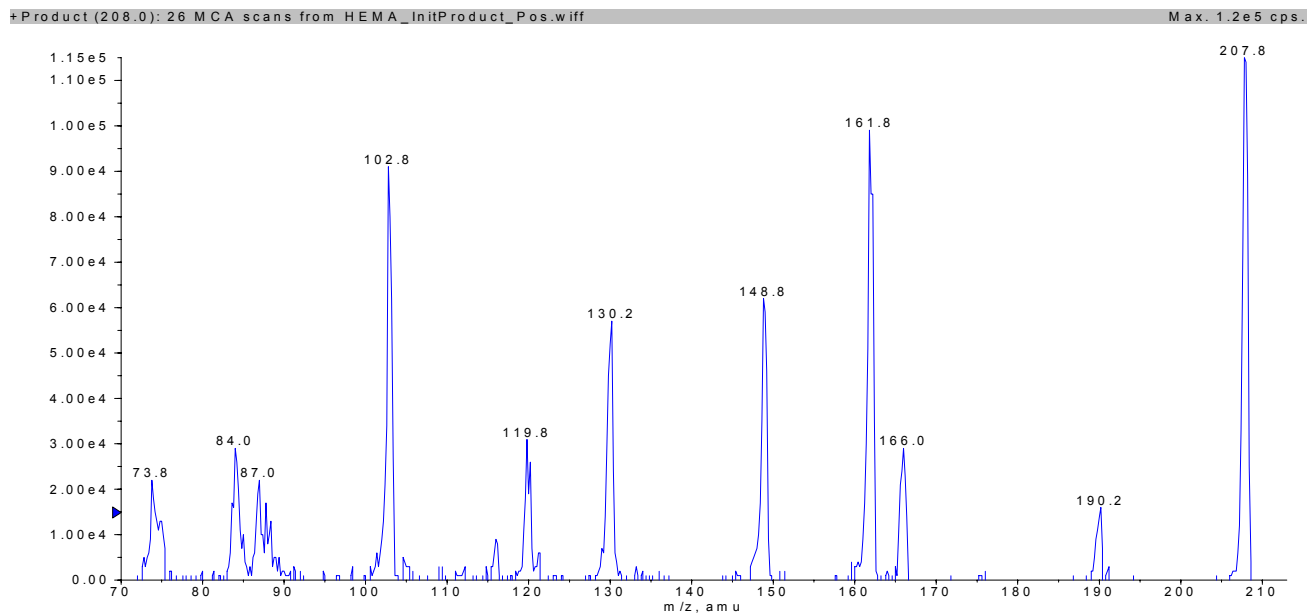
m/z (%): 222 (38) [M+H], 180 (50) [M+H]-[CH₂CO], 176 (12) [M+H]-[HCOOH], 163 (65) [M+H]-[CH₃CONH₂], 134 (8) [M+H]-[CH₂CO-HCOOH], 130 (100) [M+H]-[HOC₃H₆SH], 117 (78) [M+H]-[CH₃CONH₂-HCOOH], 91 (100) [M+H]-[CH₃CONH₂-HCOOH-C₂H₂]

Abb. 4.25: Fullscan-Spektrum von CEMA



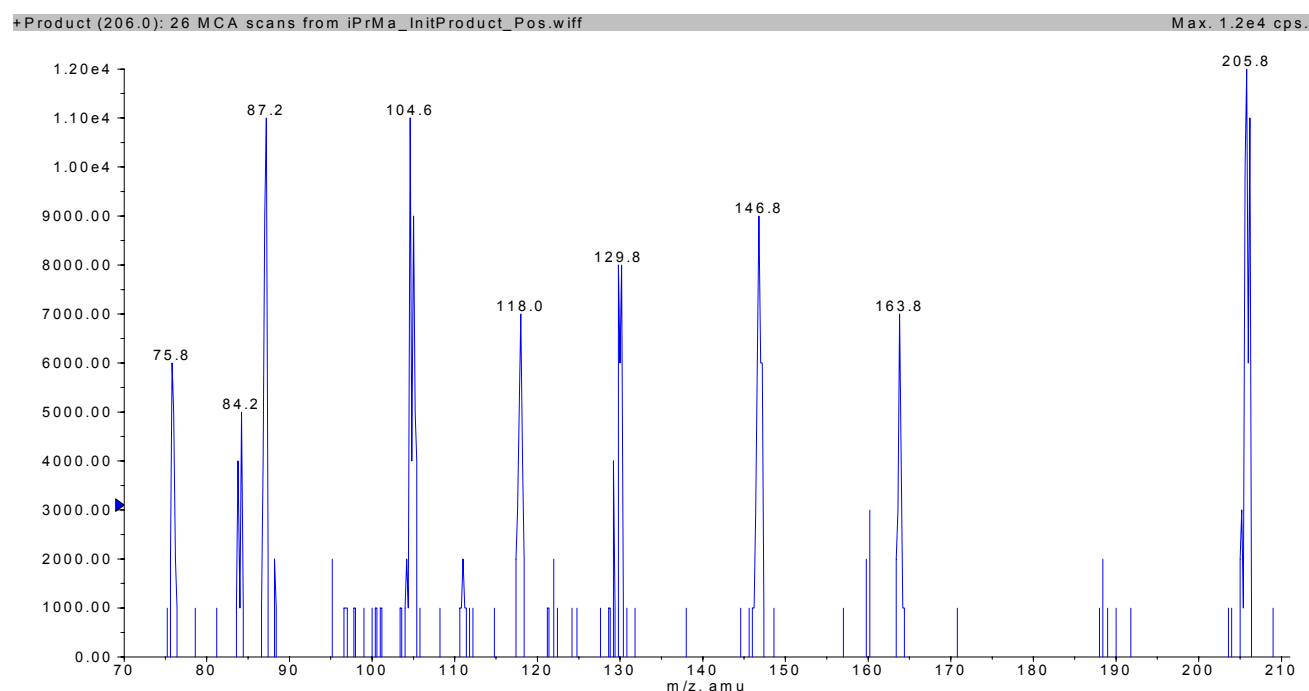
m/z (%): 217 (62) [M+H], 175 (96) [M+H]-[CH₂CO], 171 (7) [M+H]-[HCOOH], 158 (100) [M+H]-[CH₃CONH₂], 129 (73) [M+H]-[CH₂CO-HCOOH], 112 (29) [M+H]-[CH₃CONH₂-HCOOH]

Abb. 4.26: Fullscan-Spektrum von HEMA



m/z (%): 208 (100) [M+H], 190 (14) [M+H]-[H₂O], 166 (25) [M+H]-[CH₂CO], 162 (86) [M+H]-[HCOOH], 149 (54) [M+H]-[CH₃CONH₂], 130 (73) [M+H]-[RSH], 120 (27) [M+H]-[CH₂CO-HCOOH], 103 (79) [M+H]-[CH₃CONH₂-HCOOH]

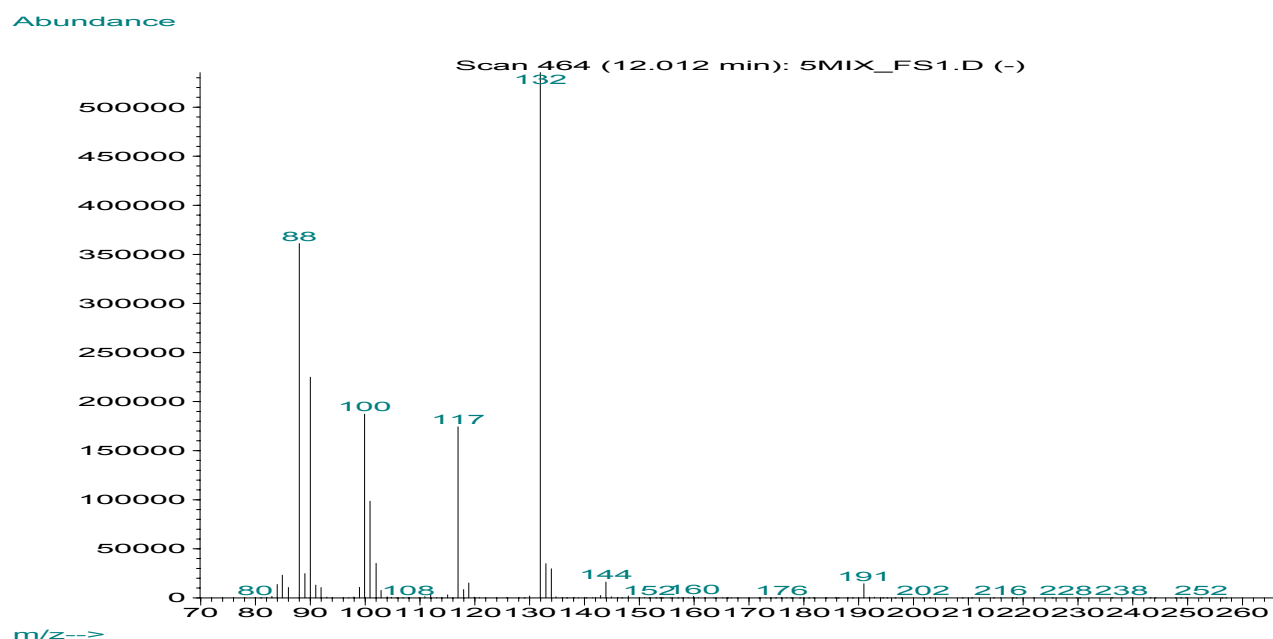
Abb. 4.27: Fullscan-Spektrum von iPrMA



m/z (%): 206 (100) [M+H], 180 (17) [M+H]-[H₂O], 164 (58) [M+H]-[CH₂CO], 147 (75) [M+H]-[CH₃CONH₂], 130 (67) [M+H]-[RSH], 118 (58) [M+H]-[CH₂CO-HCOOH]

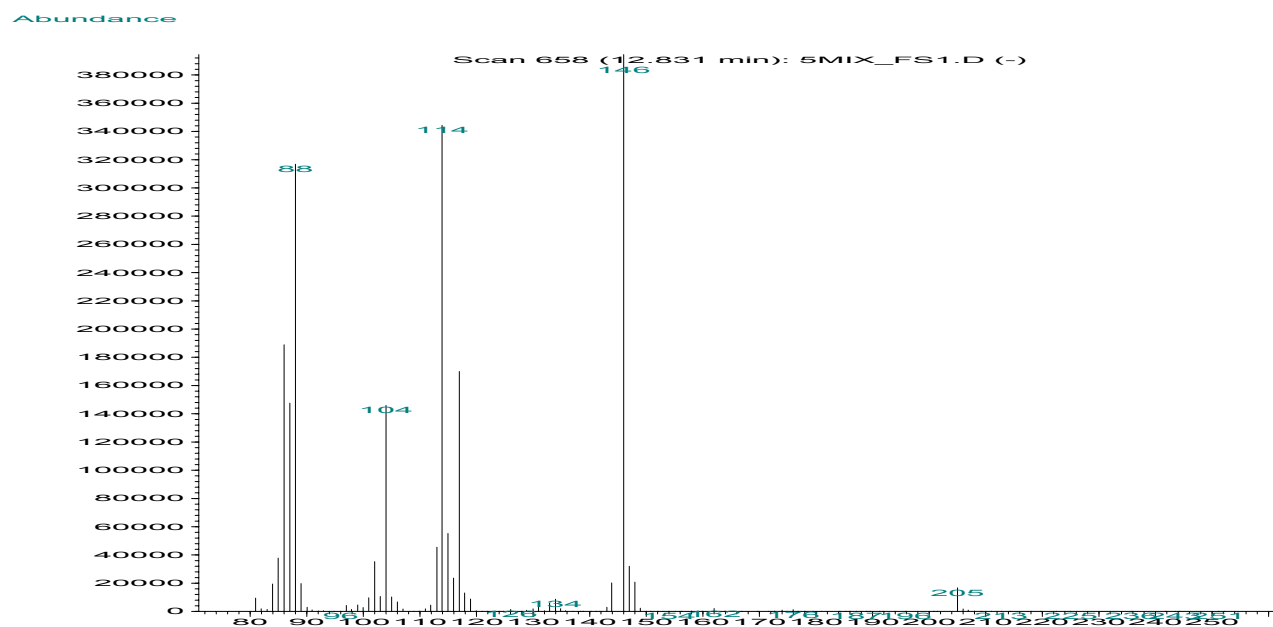
Die Abbildungen 4.28 - 4.31 zeigen die GC/MS-EI-Fullscan-Spektren von MMA, EMA, iPrMA und CEMA, jeweils nach Derivatisierung zum Methylester. Anstelle der HP 5ms wurde eine ZB 50 Säule verwendet. Die Messbedingungen und das Temperaturprogramm sind in Tabelle 3.2 angegeben. Die berechneten und gemessenen Isotopenhäufigkeiten sind im Anhang 8.3 (Tab. 8.19 – 8.22) gezeigt.

Abb. 4.28: GC/MS-EI-Fullscan-Spektrum von MMA-Methylester



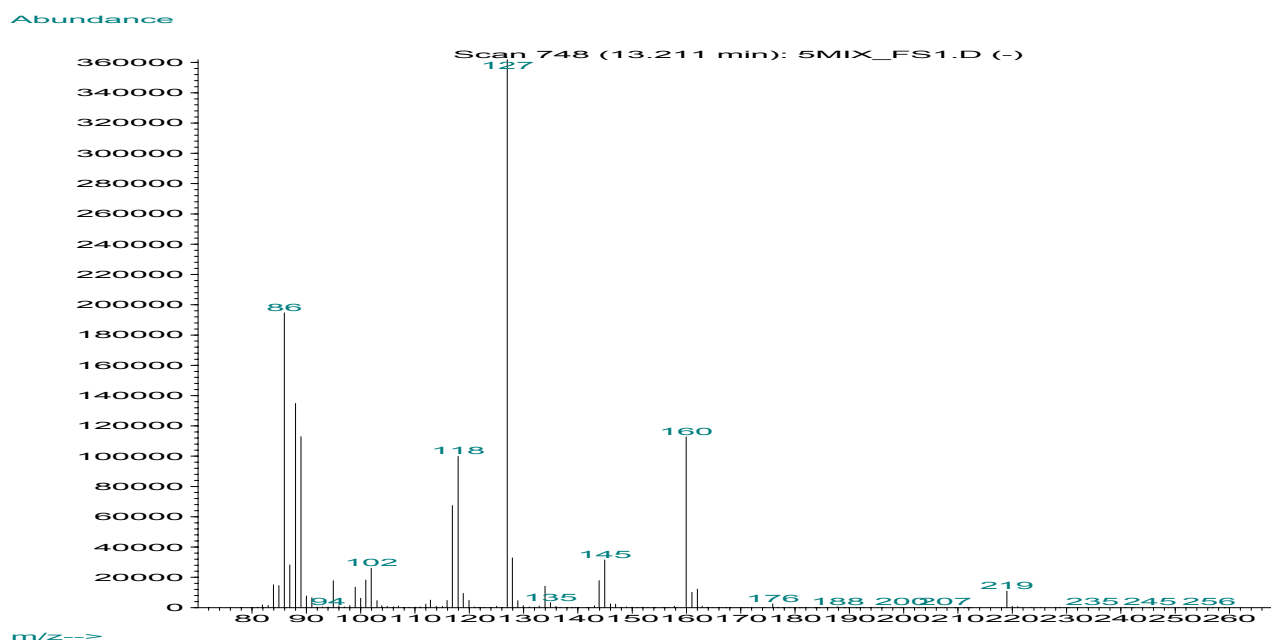
m/z (%): 191 (3) [M], 144 (3) [M]-[CH₃OH], 132 (100) [M]-[CH₃CONH₂], 117 (33), 100 (35) [M]-[CH₃CONH₂-CH₃OH], 90 (42) [M]-[CO₂CH₃-CH₂CO], 88 (67) [M]-[CH₃CONH₂-CO₂]

Abb. 4.29: GC/MS-EI Fullscan-Spektrum von EMA-Methylester



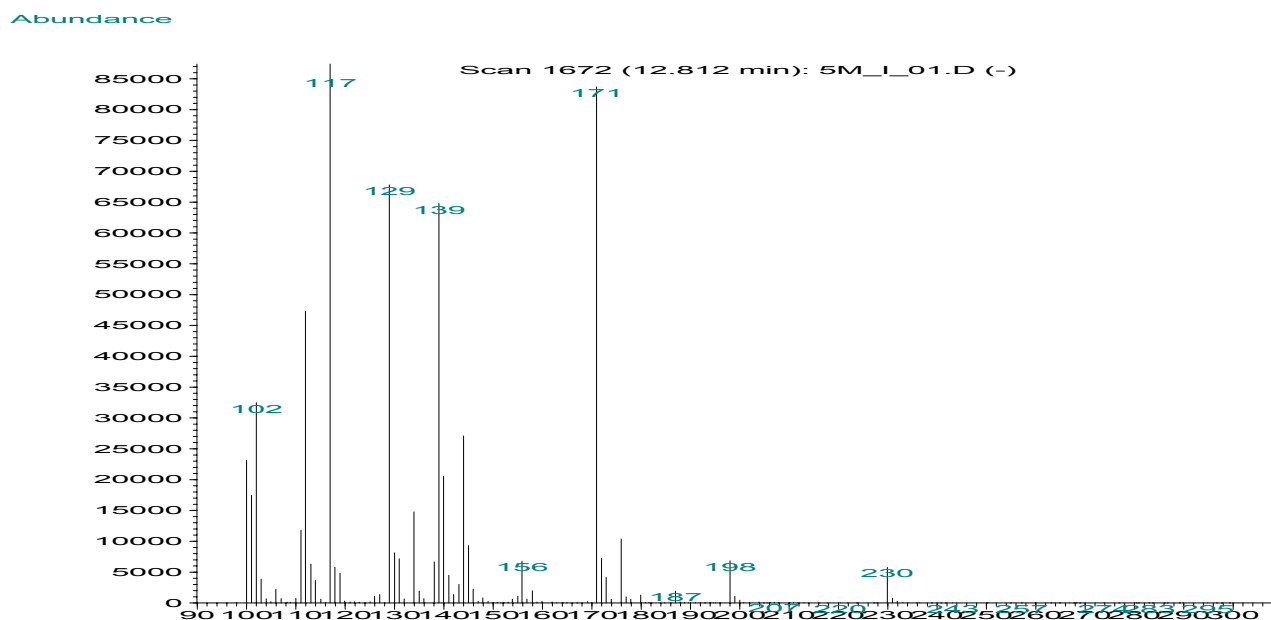
m/z (%): 205 (4) [M], 146 (100) [M]-[CH₃CONH₂], 117 (43), [M]-[CH₃CONH₂], 114 (87), [M]-[CH₃CONH₂-CH₃OH], 104 (37) [M]-[CO₂CH₃-CH₂CO], 102 (9) [M]-[CH₃CONH₂-CO₂], 88 (80) [M]-[CO₂CH₃-CH₂CO-NH₂]

Abb. 4.30: GC/MS-EI Fullscan-Spektrum von iPrMA-Methylester



m/z (%): 219 (3) [M], 160 (31) [M]-[CH₃CONH₂], 145 (9), [M]-[(CH₃)₂CS], 127 (100), [M]-[(CH₃)₂CS-H₂O], 118 (28) [M]-[CO₂CH₃-CH₂CO], 117 (19) [M]-[(CH₃)₂CS-C₂H₄], 102 (7) [M]-[CO₂CH₃-CH₂CO-NH₂], 86 (54)

Abb. 4.31: GC/MS-EI Fullscan-Spektrum von CEMA-Methylester



m/z (%): 230 (7) [M], 198 (8) [M]-[CH₃OH], 171 (96), [M]-[CH₃CONH₂], 145 (11) [M]-[NCCH₂S], 139 (74), [M]-[CH₃CONH₂-CH₃OH], 129 (78) [M]-[CO₂CH₃-CH₂CO], 117 (100) [M]-[NCCH₂S-C₂H₄]

4.2.1.5.2 Peakweite und Retentionszeit

In Tabelle 4.22 sind die Auswertungen der Retentionszeiten und Peakweiten dargestellt. Für EMA und HEMA werden die Qualitätskriterien nicht bei allen Proben erfüllt. Von den entsprechenden Proben wurden daher als Selektivitätsbestätigung mehrere Ionenübergänge pro Analyt gemessen.

Tab. 4.22: Retentionszeiten und Peakweiten der Analyten während der PAH-Studie

<i>Retentionszeiten (N = 68)</i>	<i>MMA</i> [min]	<i>EMA</i> [min]	<i>HPMA</i> [min]	<i>CEMA</i> [min]	<i>HEMA</i> [min]
MW	0,7209	1,0084	0,677	0,6193	0,6703
STABW	0,061	0,158	0,012	0,025	0,025
VK	8,5	15,7	1,8	4,0	3,7
<i>Peak Width (N = 68)</i>	<i>MMA</i> [min]	<i>EMA</i> [min]	<i>HPMA</i> [min]	<i>CEMA</i> [min]	<i>HEMA</i> [min]
MW	0,1590	0,1776	0,2163	0,2686	0,1639
STABW	0,021	0,064	0,030	0,022	0,042
VK	13,2	36,0	13,9	8,2	25,6

4.2.2 Anwendung der Methode auf die Studie

Der 6. Termin der PAH Studie wurde mit der neu entwickelten Methode untersucht. Alle Proben wurden als Triplikate bestimmt und jeder unabhängige Ansatz doppelt vermessen. Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Ansätze untereinander für die einzelnen Analyten sind größer als 0,99. In Tabelle 4.23 sind die ermittelten Werte für die einzelnen Mercaptursäuren zusammengefasst.

Tab. 4.23: Ergebnisse der Studie, eingeteilt in Nichtraucher, Passivraucher und Raucher;
Werte in µg/24 h Urin

<i>Status</i>	<i>Parameter</i>	<i>MMA</i>	<i>EMA</i>	<i>HPMA</i>	<i>CEMA</i>	<i>HEMA</i>
Nichtraucher (N = 19)	MW	62,4	14,5	577,7	1444,1	527,4
	Median	50,6	13,2	417,9	1319,2	342,8
	STABW	35,9	11,1	410,8	786,1	564,3
	SE	7,7	2,4	87,6	167,6	120,3
	Minimum	25,4	2,1	177,2	430,3	80,0
	Maximum	175,4	50,4	1849,9	3411,9	2087,4
Passivraucher (N = 23)	MW	65,9	11,2	741,8	1633,3	899,4
	Median	57,4	9,8	455,6	1419,3	514,5
	STABW	40,3	7,0	781,0	721,1	1303,9
	SE	9,2	1,6	179,2	165,4	299,1
	Minimum	11,6	2,6	106,7	658,4	152,3
	Maximum	124,5	26,4	2955,3	3096,4	5882,8
Raucher (N = 26)	MW	75,0*	14,8	1685,5*	1864,8	548,5
	Median	69,1	11,0	1569,0	1749,3	408,1
	STABW	38,5	11,3	1342,7	808,3	429,2
	SE	7,6	2,2	263,3	158,5	84,2
	Minimum	25,3	1,3	148,6	689,3	66,6
	Maximum	194,6	48,0	5804,1	3877,5	1661,3

* : MW und Median der Rauchergruppe zeigen signifikante Unterschiede zur Gruppe der Nichtraucher

Für keinen der Analyten wird ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen unbelasteten und belasteten Nichtrauchern gefunden, so dass auch hier, wie im Falle der Hämoglobinaddukte, für die weitere Auswertung auf eine Unterteilung der Gruppen verzichtet wird. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.32 dargestellt.

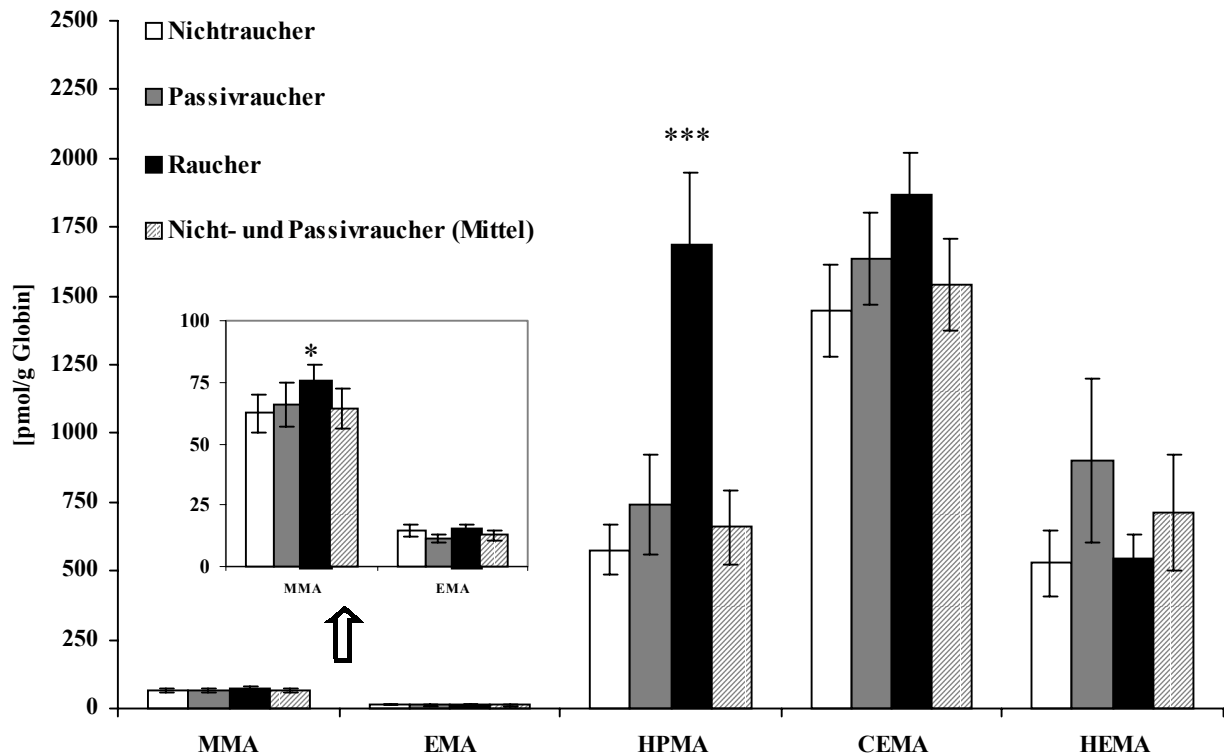


Abb. 4.32: Ergebnisse der PAH Studie, 6. Termin (MW \pm SE)

Ein typisches HPLC-MS/MS-Chromatogramm einer Raucherprobe (PAH 19) ist in Abb. 4.33 dargestellt. Die einzelnen Ionenübergänge sind nach steigender Retentionszeit angeordnet. Die Peaks sind nummeriert:

- | | | | | | | | |
|----|------|----|------------|----|------|----|-----|
| 1: | HEMA | 2: | CEMA | 3: | HPMa | 4: | MMA |
| 5: | EMA | 6: | iPrMA (IS) | | | | |

Nachteil der Methode ist, dass kein deuterierter Standard zur Verfügung steht. iPrMA stellt insofern die einzige Alternative als interner Standard dar, als sich das ebenfalls in Frage kommende n-Butyl-S-acetylcystein unter den Bedingungen des Elektrospray oder der APCI-Ionenquelle nicht ionisieren lässt.

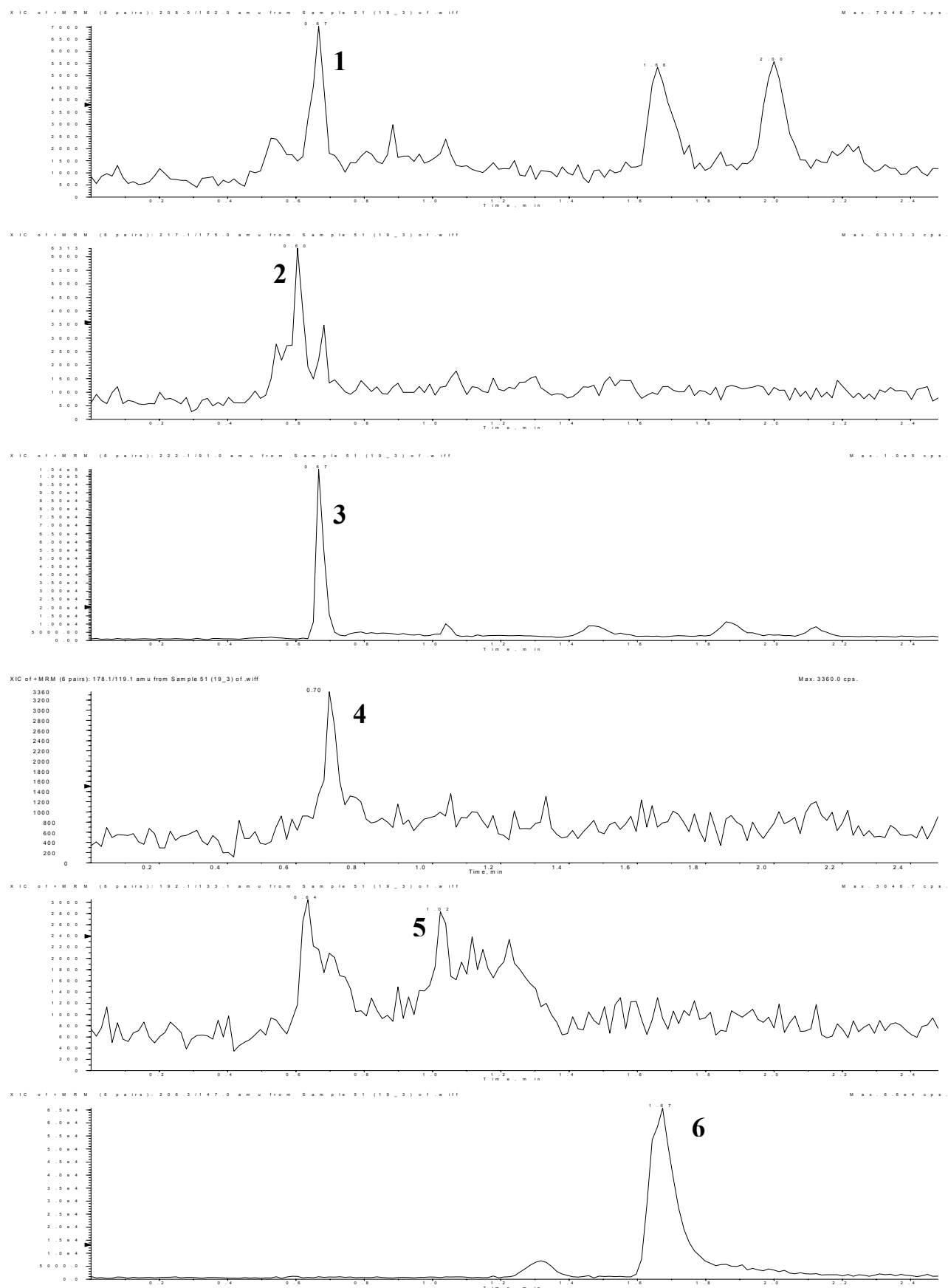


Abb. 4.33: HPLC-APCI-MS/MS-Chromatogramm einer Raucherprobe (PAH 19) nach Aufarbeitung mit Methode 3.5.5

4.3 Thioetheranalytik

4.3.1 Validierung der Methode

4.3.1.1 Präzision

Die Ergebnisse der Methodenpräzision innerhalb eines Tages sowie von Tag zu Tag sind in der Tabelle 4.24 zusammengefasst.

Tab. 4.24: Präzision und Wiederholbarkeit der Methode

	<i>Nichtraucher I</i> (<i>N</i> = 23) [µg/l]	<i>Nichtraucher II</i> (<i>N</i> = 10) [µg/l]
MW	45,4	17,9
STABW	7,5	2,8
VK	16,5	15,6

4.3.1.2 Wiederfindung

Eine Bestimmung der Wiederfindung wurde nicht durchgeführt. In der Literatur finden sich jedoch Angaben, dass sich die Wiederfindungsraten der einzelnen Thioether stark voneinander unterscheiden [156].

4.3.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ist aus der Kalibrierung nach der Leerwertmethode bestimmt worden. Die errechnete NWG beträgt 4,7 µmol/l, die BSG entsprechend 14,1 µmol/l Urin.

4.3.1.4 Linearität

Die Methode zeigt im Bereich von 6 bis 360 µmol/l Urin ein lineares Verhalten. Der ermittelte Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,9987$ ist über den Messbereich hinreichend genau.

4.3.1.5 Selektivität

Da es sich um eine Sammelmethode handelt, kann keine Selektivität angegeben werden.

4.3.1.6 Korrelation mit Photometermethode

Die Ergebnisse der Vergleichsmessungen sind in Tab 4.25 angegeben. Auf eine Messung der Proben der Studie Biomonitoring 2000 bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde verzichtet, weil nach den Messungen von Proband 67 (PAH-Studie) feststand, dass die Extinktionen bei dieser Wellenlänge für Nichtraucherproben zu gering sind.

Tab. 4.25: Vergleich zwischen Photometer- und Readermessungen

<i>Probe</i>	<i>Photometer</i>			<i>Reader</i>		
	$\lambda = 412 \text{ nm}$			$\lambda = 405 \text{ nm}$		$\lambda = 450 \text{ nm}$
	[$\mu\text{mol/l}$]			[$\mu\text{mol/l}$]		[$\mu\text{mol/l}$]
PAH Studie Proband 67, (N = 15)						
MW	25,6			22,9		23,0
STABW	2,9			3,5		9,2
VK [%]	11,3			15,0		39,9
BM00/1_1	106,9			99,1		-
BM00/1_2	100,9			107,2		-
BM00/2_1	39,4			32,2		-
BM00/2_2	34,9			33,8		-
BM00/3_1	97,2			91,6		-
BM00/3_2	94,5			91,3		-
BM00/4_1	49,7			44,1		-
BM00/4_2	45,9			45,9		-
BM00/5_1	66,4			61,9		-
BM00/5_2	65,1			58,8		-

In Abb. 4.34 ist die Korrelation zwischen den Photometer- und Readermesswerten gezeigt. Die gestrichelten Linien geben das 95 % Konfidenzintervall an.

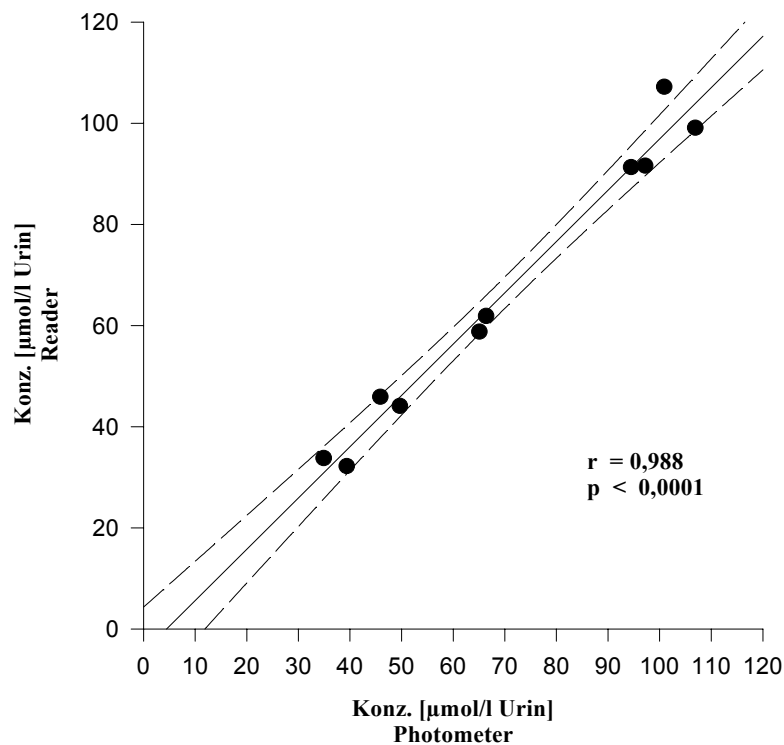


Abb. 4.34: Korrelation zwischen Photometer- (412 nm) und Readermessung (405 nm)

4.3.2 Anwendung der Methode auf die Studie

Mit der vorgestellten Methode ist der 6. Termin der PAH-Studie untersucht worden. In Tabelle 4.26 sind die ermittelten Ergebnisse und die prozentualen Anteile der einzelnen Mercaptursäuren an der Thioether-Gesamtausscheidung dargestellt. Ähnlich den Ergebnissen der Hb-Addukte und der Mercaptursäuren sind zwischen Nichtrauchern und Passivrauchern keine relevanten Unterschiede feststellbar, weshalb die Gruppen zusammengefasst werden können. Die Thioetherausscheidung wird für die weitere Auswertung (4.5) zu Standardisierungszwecken auf Kreatinin bezogen.

Tab. 4.26: Thioether-Messwerte und Anteil der Mercaptursäuren an der Gesamtausscheidung

<i>Status</i>	<i>Parameter</i>	<i>Thioether</i> [μmol/24 h Urin]	<i>Thioether</i> [μmol/g Kreatinin]	<i>MMA</i> [%]	<i>EMA</i> [%]	<i>HPMA</i> [%]	<i>CEMA</i> [%]	<i>HEMA</i> [%]
Nichtraucher (N = 19)	MW	91,1	66,3	0,41	0,08	2,86	7,33	2,79
	Median	84,7	64,4					
	STABW	36,4	12,7					
	SE	7,8	2,7					
	Minimum	21,0	45,6					
	Maximum	172,8	86,4					
Passivraucher (N = 23)	MW	87,6	70,8	0,42	0,07	3,83	8,62	4,95
	Median	90,6	68,0					
	STABW	44,4	21,8					
	SE	10,2	5,0					
	Minimum	25,5	30,1					
	Maximum	163,8	117,2					
Raucher (N = 27)	MW	155,7*	108,8*	0,27	0,05	4,89	5,54	1,70
	Median	152,0	100,0					
	STABW	74,1	44,2					
	SE	14,3	8,5					
	Minimum	65,1	59,0					
	Maximum	460,8	250,7					

* : MW und Median der Rauchergruppe zeigen signifikante Unterschiede zur Gruppe der Nichtraucher

4.4 3-Alkyladenin-Analytik

4.4.1 Validierung der Methode

4.4.1.1 Präzision

Die Ergebnisse der Methodenpräzision in der Serie sowie von Tag zu Tag sind in der Tabelle 4.27 zusammengefasst.

Tab. 4.27: Präzision und Wiederholbarkeit der Methode

	<i>3-MeAde</i> [ng/Injektion]	<i>3-EtAde</i> [ng/Injektion]
Pool I (N = 8)		
MW <i>inter day</i>	51,03	1,66
STABW	3,17	0,08
VK	6,2	4,7
Pool II (N = 8)		
MW <i>inter day</i>	56,23	1,07
STABW	4,29	0,08
VK	7,6	7,7
Pool I (N = 10)		
MW <i>intra-day</i>	48,59	1,66
STABW	5,69	0,07
VK	11,7	4,3
Pool II (N = 10)		
MW <i>intra-day</i>	53,53	1,14
STABW	4,61	0,10
VK	8,6	9,0

4.4.1.2 Wiederfindung

4.4.1.2.1 Absolute Wiederfindungsrate

Die absolute Wiederfindungsrate über das Gesamtverfahren kann nur aus PBS-Puffer bestimmt werden, da in Matrixproben ein Grundlevel an Alkyladeninen nachweisbar ist. Die für eine Bestimmung der absoluten Wiederfindung notwendigen deuterierten Referenzmaterialien stehen nicht zur Verfügung, so dass auf die Bestimmung der absoluten Wiederfindungsrate aus Matrixproben verzichtet wird. Bei Messung der PBS-Pufferproben sind die absoluten Intensitäten der Analyten auf Grund der Ionensuppression in Matrixproben nicht mit Realproben vergleichbar. Daher wird für Matrixproben mit Dotierexperimenten eine relative Wiederfindungsrate bestimmt (4.4.1.2.2). In Tabelle 4.28 sind die absoluten Wiederfindungsraten aus PBS-Puffer zusammengefasst.

Tab. 4.28: Absolute Wiederfindungsraten über das Gesamtverfahren aus PBS-Puffer

<i>Pool (N = 8)</i>	<i>3-MeAde</i> [ng/Injektion]	<i>3-EtAde</i> [ng/Injektion]
Puffer dotiert vor SPE MW	14,9	0,20
Puffer dotiert nach SPE MW	24,7	0,25
Tiefster Wert	14,1	0,20
Höchster Wert	16,2	0,21
rel. WFR [%]	57 – 65	79 – 84

4.4.1.2.2 Relative Wiederfindungsrate

Die Ergebnisse und die Wiederfindungsraten für Realproben sind in den Tabellen 4.29 und 4.30 angegeben.

Der Konzentrationsbereich 1 umfasst eine Dotierung der Poolproben mit 40 ng abs. 3-MeAde und 5 ng abs. 3-EtAde.

Tab. 4.29: 8 Poolproben dotiert im Konzentrationsbereich 1

<i>Pool (N = 8)</i>	<i>3-MeAde</i> [ng/Injektion]	<i>3-EtAde</i> [ng/Injektion]
Pool Leerwert MW	51,03	1,66
Pool dotiert Sollwert	61,03	2,91
MW gefunden	62,7	3,05
Tiefster Wert	52,37	2,91
Höchster Wert	63,77	3,42
rel. WFR [%]	86 – 104	100 – 118

Der Konzentrationsbereich 2 umfasst eine Dotierung der Poolproben mit 400 ng abs. 3-MeAde und 20 ng abs. 3-EtAde.

Tab. 4.30: 8 Poolproben dotiert im Konzentrationsbereich 2

<i>Pool (N = 8)</i>	<i>3-MeAde</i> [ng/Injektion]	<i>3-EtAde</i> [ng/Injektion]
Pool Leerwert MW	51,03	1,66
Pool dotiert Sollwert	151,03	6,66
MW gefunden	137,6	7,11
Tiefster Wert	124,81	6,87
Höchster Wert	150,07	7,44
rel. WFR [%]	83 – 97	103 – 112

4.4.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

In Tab. 4.31 sind die Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BSG) für die neuentwickelte Methode über das Gesamtverfahren für PBS-Pufferproben angegeben. Tab. 4.32 fasst die entsprechenden Ergebnisse für Realproben zusammen.

Tab. 4.31: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen über das Gesamtverfahren für PBS-Pufferproben

<i>Analyt</i>	<i>Verfahren</i>	<i>NWG</i>		<i>BSG</i>	
		[pg/Injektion]	[pg/ml Puffer]	[pg/Injektion]	[pg/ml Puffer]
3-MeAde	Leerwert	100	8,0	330	26,4
	Signal/Rauschen	10	0,80	33	2,64
3-EtAde	Leerwert	100	8,0	330	26,4
	Signal/Rauschen	5,0	0,40	16,5	1,32

Tab. 4.32: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen über das Gesamtverfahren für Realproben

<i>Analyt</i>	<i>Verfahren</i>	<i>NWG</i>		<i>BSG</i>	
		[ng/Injektion]	[ng/ml Urin]	[ng/Injektion]	[ng/ml Urin]
3-MeAde	Leerwert	11,4	0,9	32,7	3,0
	Signal/Rauschen	0,025	0,002	0,075	0,006
3-EtAde	Leerwert	0,258	0,021	0,774	0,069
	Signal/Rauschen	0,0214	0,0017	0,064	0,0056

4.4.1.4 Linearität

Die Methode zeigt für 3-MeAde im Bereich von 0,1 bis 2000 ng/Injektion und für 3-EtAde im Bereich von 1 pg bis 2500 pg/Injektion ein lineares Verhalten. Tab 4.33 zeigt die ermittelten Korrelationskoeffizienten und den daraus ermittelten linearen Bereich.

Tab. 4.33: Geradengleichung und Korrelationskoeffizienten der Analyten bezogen auf den IS [D₅]-3-EtAde

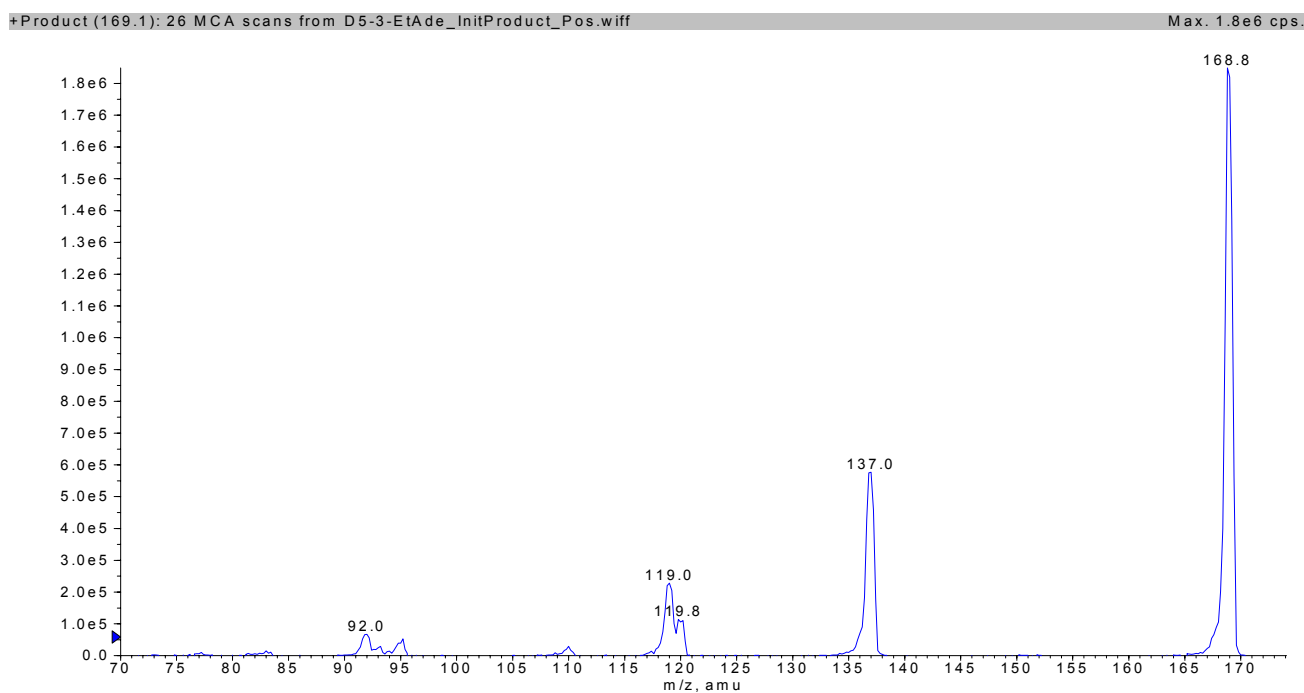
<i>Analyt</i>	<i>Geradengleichung</i>	<i>Korr.-Koeffizient</i>
3-MeAde	y=0,0388x+0,9903	R ² = 0,9966
3-EtAde	y=0,2552x+0,0416	R ² = 0,9964

4.4.1.5 Selektivität

4.4.1.5.1 Charakterisierung der Analyten und des internen Standards durch Q1-Fullscan-Spektren

In den Abbildungen 4.35 bis 4.39 sind die Fullscan-Massenspektren der 3-Alkyl-adenine gezeigt. Im Gegensatz zu den GC/MS-Spektren werden bei Infundierung der Analyten über die Spritzenpumpe mehrere Einzel-Scans aufsummiert (MCA-Scans). Dadurch nehmen die absoluten Intensitäten zu und die Signale werden breiter.

Abb. 4.35: Fullscan-Spektrum des internen Standards [D₅]-3-EtAde



m/z (%): 169 (100) [M+H], 137 (31) [M+H]-[C₂D₄], 119 (19) [M+H]-[C₂D₄-NDH₂], 92 (5) [M+H]-[C₂H₄-NDH₂-HCN]

Abb. 4.36: Fullscan-Spektrum von 3-MeAde

+Product (150.1): 26 MCA scans from D0-3-MtAde_InitProduct_Pos.wiff Max. 2.0e6 cps.

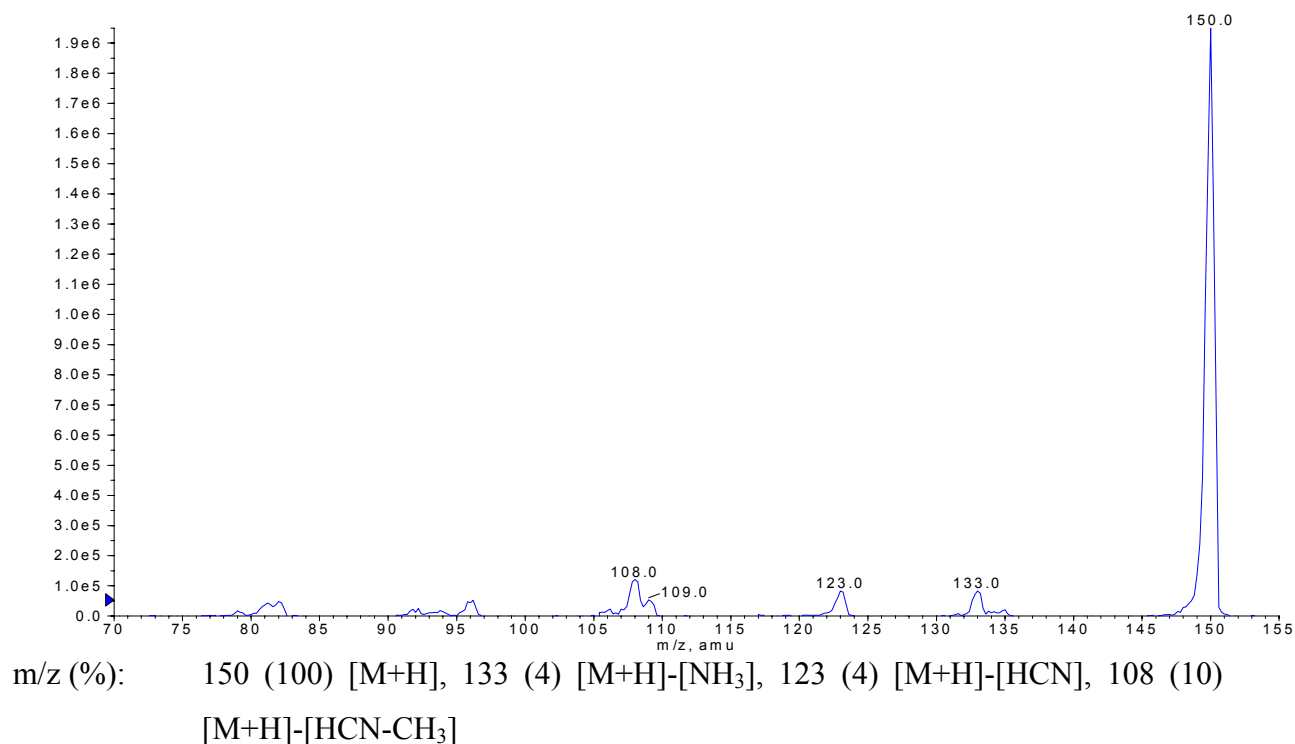


Abb. 4.37: Fullscan-Spektrum von 3-EtAde

+Product (164.1): 26 MCA scans from D0-3-EtAde_InitProduct_Pos.wiff Max. 7.0e5 cps.

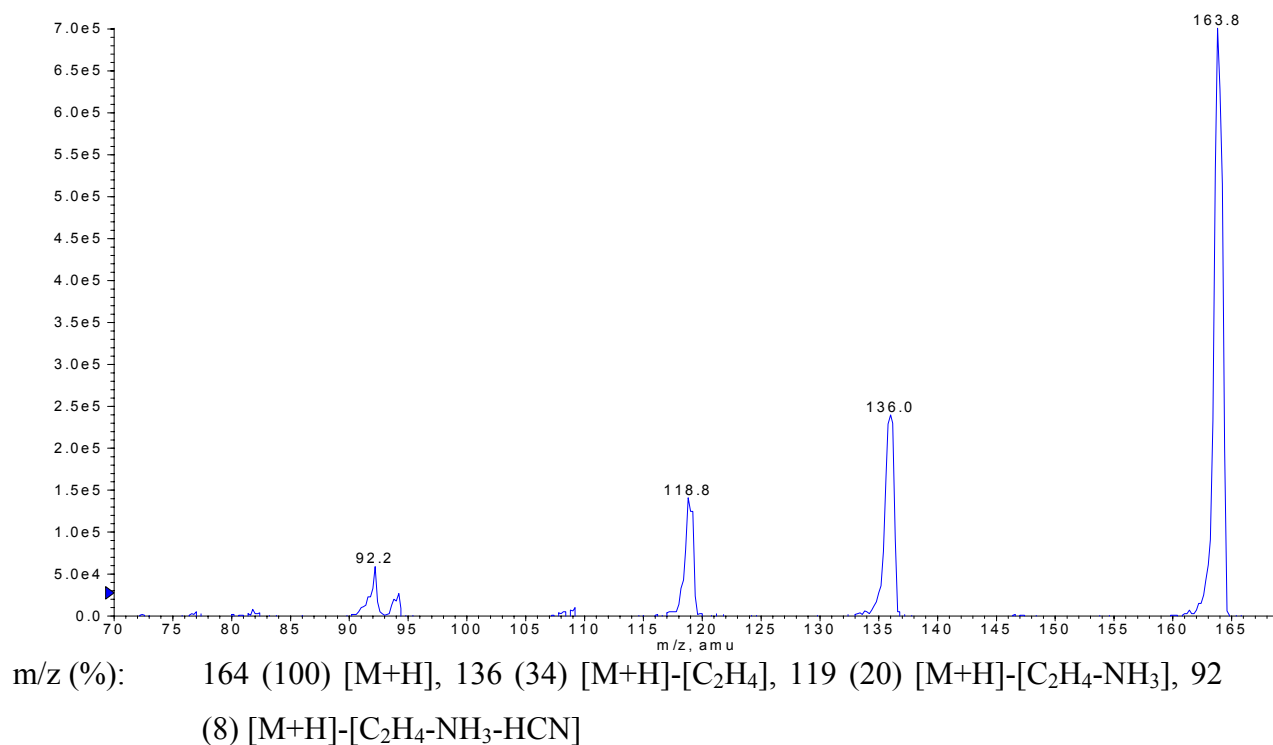
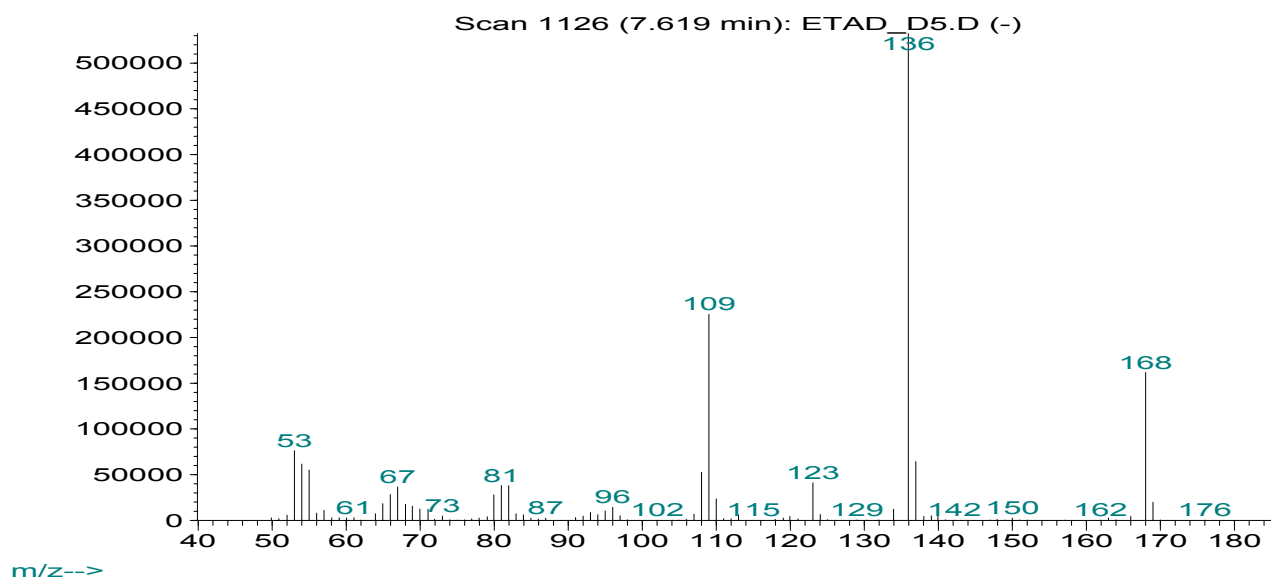


Abb. 4.38: GC-MS-Fullscan-Spektrum von [D₅]-3-EtAde

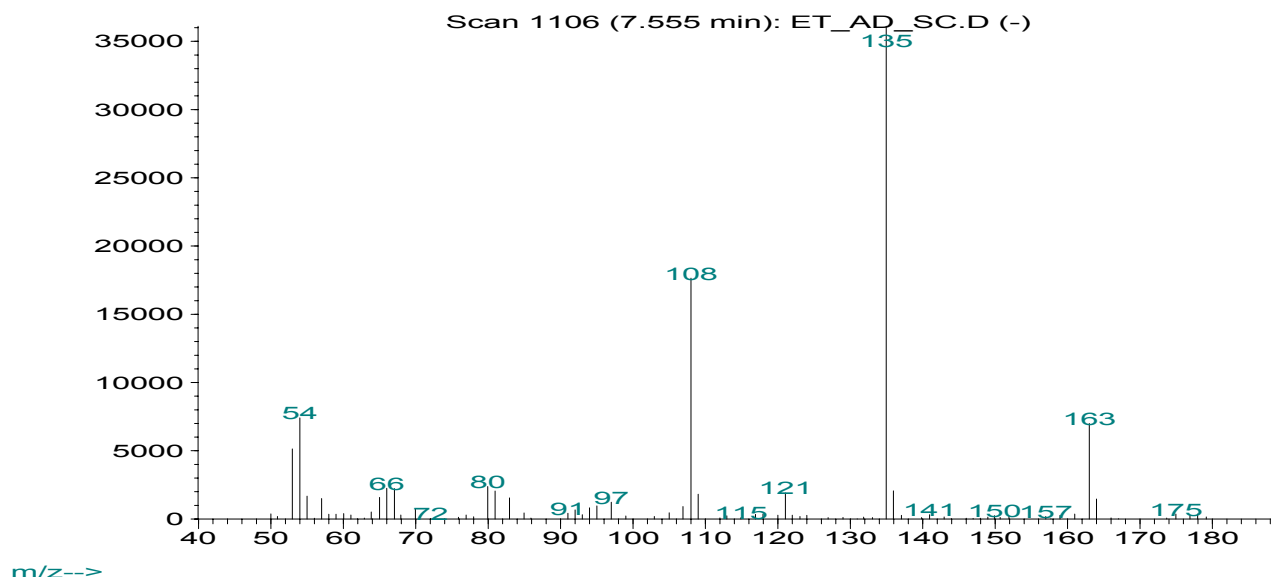
Abundance



m/z (%): 168 (30) [M], 136 (100) [M]-[C₂D₄], 109 (42) [M]-[C₂D₄-HCN], 81 (7) [M]-[C₂D₄-HCN-DCN], 54 (12) [M]-[C₂D₄-HCN-DCN-HCN]

Abb. 4.39: GC-MS-Fullscan-Spektrum von 3-EtAde

Abundance



m/z (%): 163 (19) [M], 135 (100) [M]-[C₂H₄], 121 (5) [M]-[CH₂N₂], 108 (49) [M]-[C₂H₄-HCN], 81 (6) [M]-[C₂H₄-HCN-HCN], 54 (21) [M]-[C₂H₄-HCN-HCN-HCN]

4.4.1.5.2 Peakweite und Retentionszeit

Als Retentionszeitmarker und als zusätzliches Identifikationskriterium ist 9-EtAde in einer Konzentration von 50 ng abs. zu jeder Studienprobe zudosiert worden. Der VK der mittleren Retentionszeit (\pm STABW) von 5,51 (\pm 0,005) min beträgt 0,1 %, Minimal- und Maximalwert (5,50 bzw. 5,52 min) liegen innerhalb der Toleranzgrenzen.

4.4.2 Anwendung der Methode auf die Studie

Der 6. Termin der PAH-Studie ist mit der unter 3.7.5 beschriebenen Methode in zwei unabhängigen Ansätzen pro Probe untersucht worden. Jeder der Ansätze wurde doppelt vermessen. Die Ergebnisse fasst Tab. 4.34 zusammen.

Tab. 4.34: Ergebnisse der 3-Alkyladenin-Messungen der PAH-Studie

<i>Status</i>	<i>Parameter</i>	<i>3-MeAde</i> [$\mu\text{g}/24 \text{ h Urin}$]	<i>3-EtAde</i> [ng/24 h Urin]
Nichtraucher (N = 17)	MW	4,9	35,4
	Median	3,8	17,9
	STABW	4,9	43,3
	SE	1,0	9,2
	Minimum	0,2	1,3
	Maximum	21,3	158,2
Passivraucher (N = 22)	MW	3,6	36,5
	Median	3,3	10,8
	STABW	2,5	48,9
	SE	0,6	11,2
	Minimum	n.n.	1,5
	Maximum	8,7	166,4
Raucher (N = 27)	MW	10,5	132,2
	Median	9,9	100,2
	STABW	7,7	156,2
	SE	1,5	30,1
	Minimum	0,4	17,1
	Maximum	31,8	870,4

Die Ergebnisse sind in den Abb. 4.40 und 4.41 als Boxplots graphisch dargestellt. Die horizontalen Linien innerhalb der Kästen repräsentieren den Median, die Kästen selbst 80 % aller Messwerte. Die Fehlerbalken nach unten und oben geben das 5. und 95. Percentil an. Die Werte außerhalb der angegebenen Grenzen sind durch Kreise symbolisiert. Bei den Nichtrauchern liegen 4 Werte (18 %) unterhalb der Bestimmungsgrenze. Für diese Proben wird die halbe Nachweisgrenze als Wert angenommen. Bei den Passivrauchern liegt 1 Wert (5 %) unterhalb der Bestimmungsgrenze. Auch hier wird die halbe Nachweisgrenze eingesetzt.

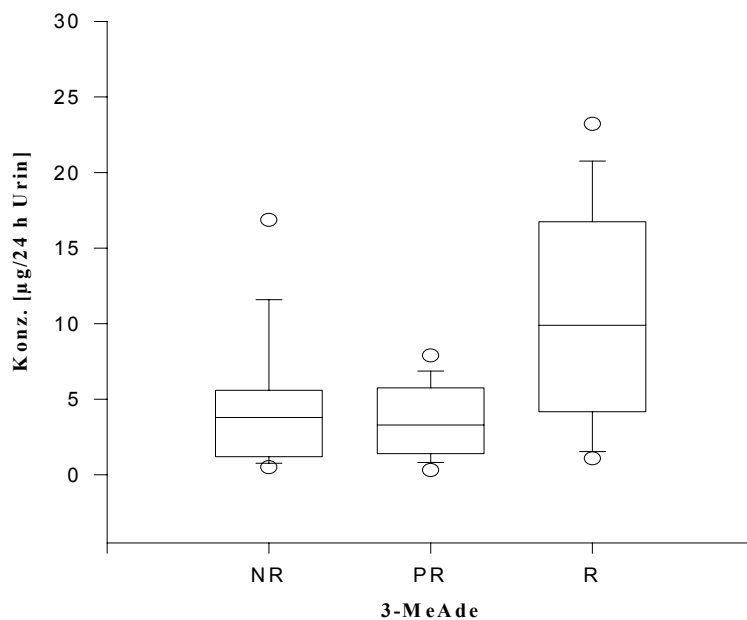


Abb. 4.40: Ergebnisse der PAH-Studie in Abhängigkeit vom Rauchstatus für 3-MeAde

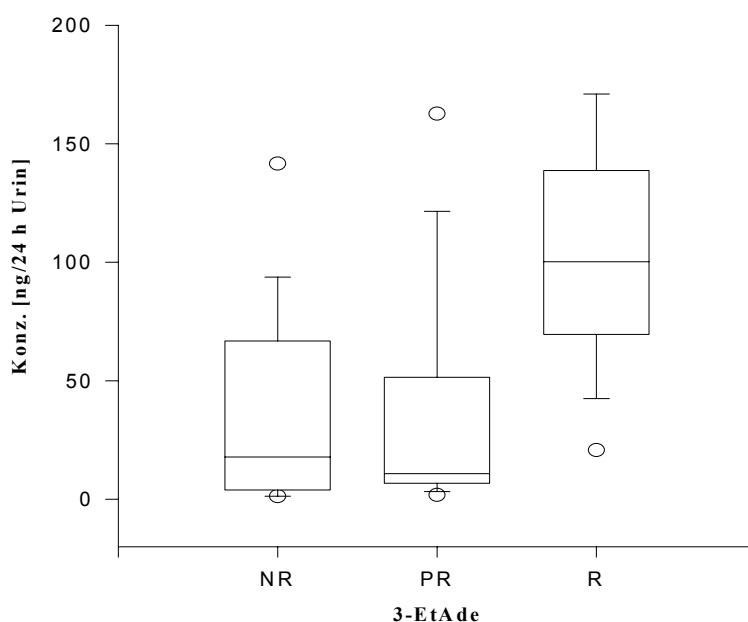


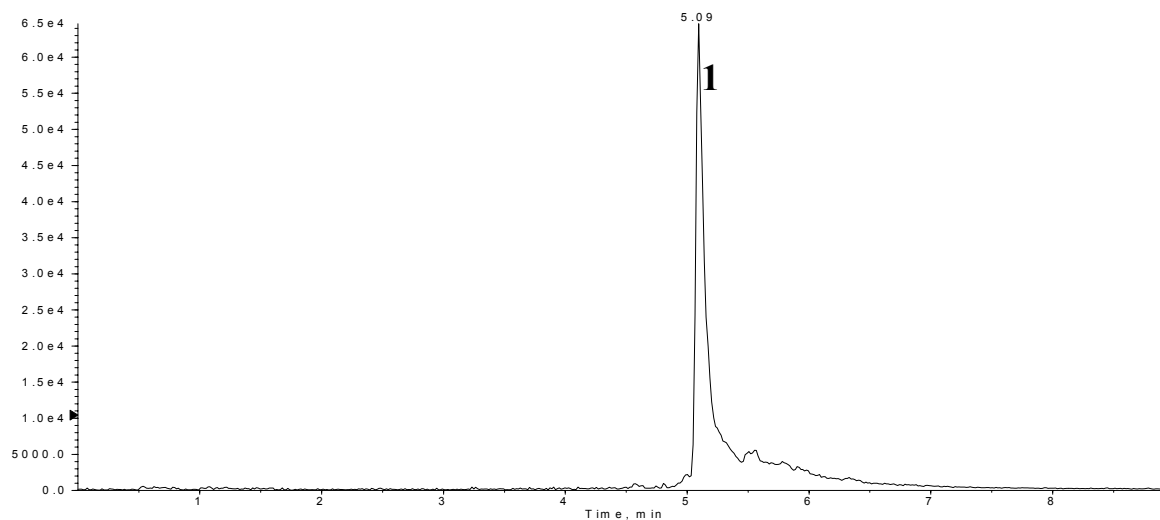
Abb. 4.41: 3-EtAde-Adduktlevel der PAH-Studie in Abhängigkeit vom Rauchstatus

Ein typisches HPLC-MS/MS-Chromatogramm einer Raucherprobe (PAH 19) ist in Abb. 4.42 dargestellt. Die Peaks sind nicht geglättet dargestellt, obwohl die Software die Möglichkeit dazu bietet. Zur Auswertung wird eine zweifache Glättung angewandt. Die einzelnen Ionenübergänge sind so angeordnet, dass der interne Standard zuerst ausgegeben wird, gefolgt von den Analyten nach zunehmender Retentionszeit geordnet. Alle Analytpeaks und der Peak des Retentionszeitmarkers 9-EtAde sind nummeriert.

- | | | | | | |
|----|--------------------------------|----|---------|----|---------|
| 1: | [D ₅]-3-EtAde (IS) | 2: | 3-MeAde | 3: | 3-EtAde |
| 4: | 9-EtAde | | | | |

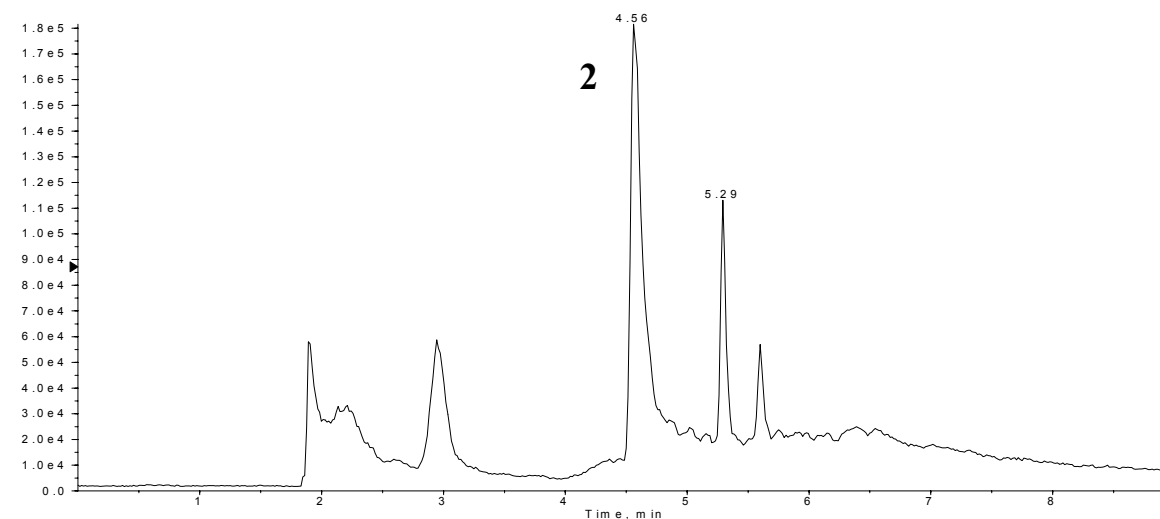
XIC of +MRM (3 pairs): 169.0/136.3 amu from Sample 31 (PAH96_19_1) of GA1_MCX.wiff

Max. 6.5e4 cps.



XIC of +MRM (3 pairs): 150.0/123.0 amu from Sample 31 (PAH96_19_1) of GA1_MCX.wiff

Max. 1.8e5 cps.



XIC of +MRM (3 pairs): 164.0/136.0 amu from Sample 31 (PAH96_19_1) of GA1_MCX.wiff

Max. 8.6e4 cps.

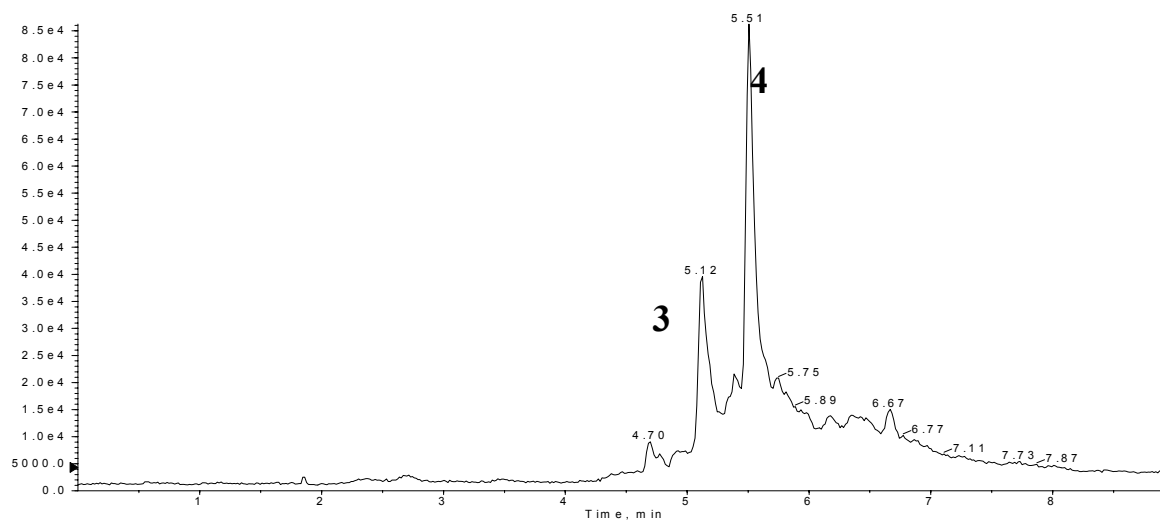


Abb. 4.42: HPLC-APCI-MS/MS-Chromatogramm einer Raucherprobe (PAH 19) nach Aufarbeitung nach Methode 3.7.5

4.5 Auswertung der Studie

Alle Berechnungen werden mit dem Programm SPSS 8.0 durchgeführt. Die Korrelationskoeffizienten werden bivariant nach Pearson berechnet. Der Signifikanztest erfolgt ebenfalls beidseitig. Die Einzelwerte jedes Probanden für die entsprechenden Analyten sind im Anhang 8.3 (Tab. 8.2) zusammengefasst.

4.5.1 Zusammenhang mit Tabakrauchexposition

Die Probanden sind nach ihren eigenen Angaben in 3 Gruppen eingeteilt worden: Nichtraucher (N = 23), passivrauchbelastete Nichtraucher (N = 19) und Raucher (N = 27). Einige Charakteristika der 3 Untergruppen sind im Anhang 8.3 (Tab. 8.1) dargestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Biomarker zeigen keinerlei Unterschiede zwischen ETS-belasteten und unbelasteten Nichtrauchern, so dass diese beiden Gruppen im Folgenden zur Gruppe der Nichtraucher (N = 42) zusammengefasst werden.

Um die Einteilung zu objektivieren, sind die Angaben der Probanden durch Messung von Cotinin und Nikotin auf Personalsamplern verifiziert worden. Die Korrelationen, die mit Cotinin (Plasma und Urin), Thiocyanat, ETS-Stunden und Nikotin aufgestellt werden, beziehen sich auf die jeweiligen Mittelwerte dieser Parameter über alle 6 Termine der Studie. Dieses Vorgehen ist insofern sinnvoll, als es die Lebensdauer der Erythrozyten von 120 Tagen berücksichtigt und keinen größeren Schwankungen beispielsweise durch die Ernährung unterworfen sein sollte. Bei der Auswertung der Hämoglobinaddukte werden bis auf HyEtVal die Werte nach Methode 4.5.4.2.1 (mit SPE) angegeben. Die Korrelationen der Biomarker sind in einer Tabelle zusammengefasst und ausgewählte signifikante Zusammenhänge in Abbildungen dargestellt.

4.5.1.1 Rauchergruppe

Raucher zeigen statistisch hoch signifikante Korrelationen zwischen Cotinin im Urin und MeVal (Abb. 4.43), HyEtVal (Abb. 4.44), und CyEtVal (Abb. 4.45).

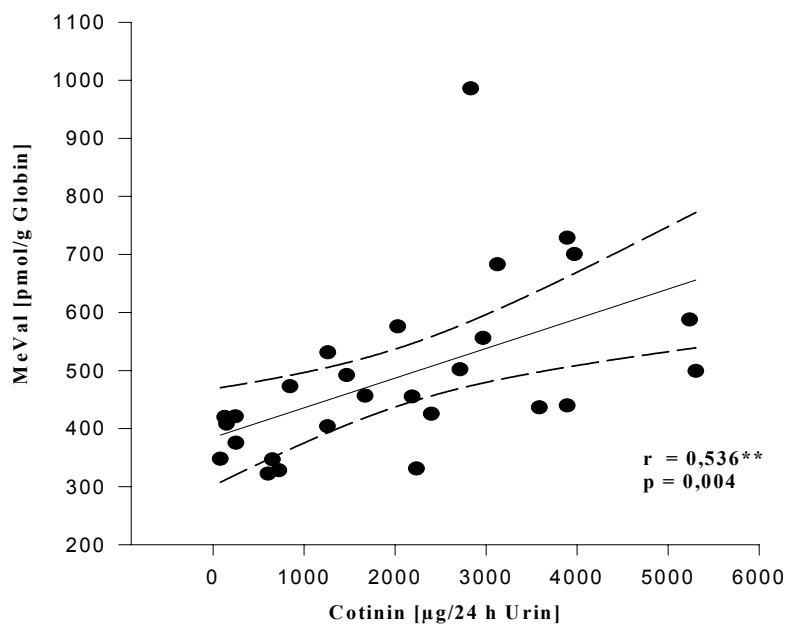


Abb. 4.43: Korrelation MeVal vs. Cotinin im Urin (Raucher, N = 27)

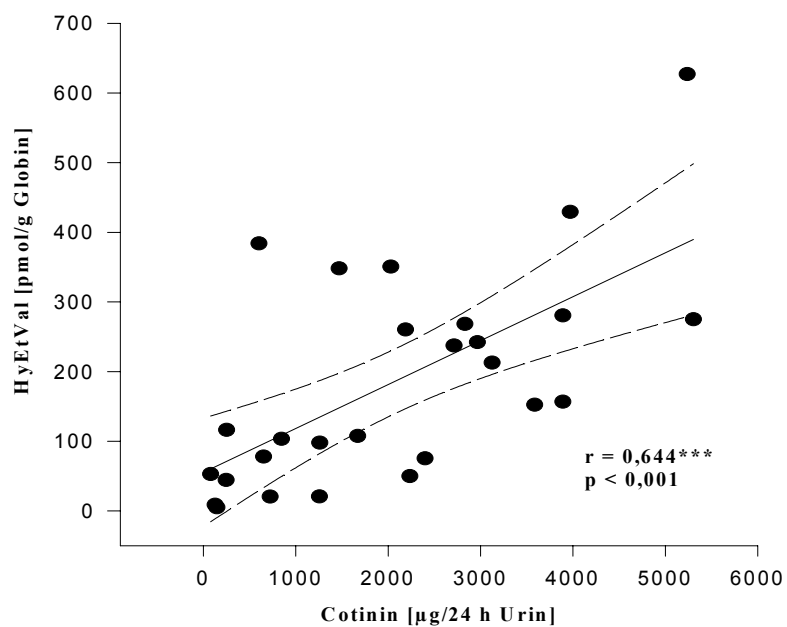


Abb. 4.44: Korrelation HyEtVal vs. Cotinin im Urin (Raucher, N = 26)

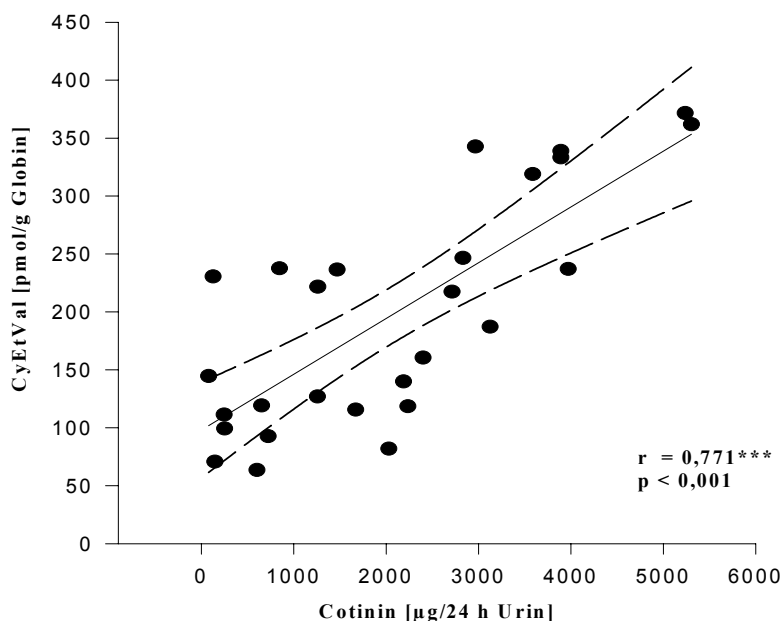


Abb. 4.45: Korrelation CyEtVal vs. Cotinin im Urin (Raucher, N = 27)

Zwischen EtVal und Cotinin (Plasma und Urin) wird kein signifikanter Zusammenhang gefunden. Demnach trägt das Aktivrauchen nicht zu einer Erhöhung der Ethylvalin-Adduktrate bei. Einen deutlichen Zusammenhang zum Cotinin im Urin findet sich auch bei MMA (Abb. 4.46) und HPMA (Abb. 4.47). Bei den übrigen Mercaptursäuren zeigt sich kein Einfluss des Aktivrauchens. Ein möglicher Zusammenhang zwischen CEMA und Cotinin kann nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zum entsprechenden Hämoglobinaddukt zeigt auch die Hydroxyethylmercaptursäure (HEMA) keine Korrelationen zu Cotinin, und zwar weder im Plasma noch im Urin.

Literaturdaten, die einen Zusammenhang zwischen der Thioetherausscheidung und dem Rauchverhalten herstellen, können bestätigt werden (Abb. 4.48).

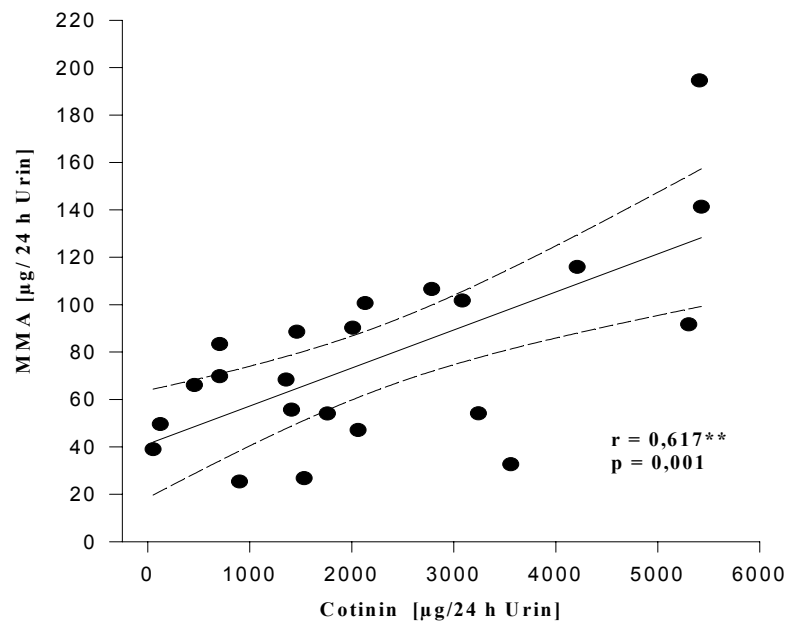


Abb. 4.46: Korrelation MMA vs. Cotinin im Urin (Raucher, N = 22)

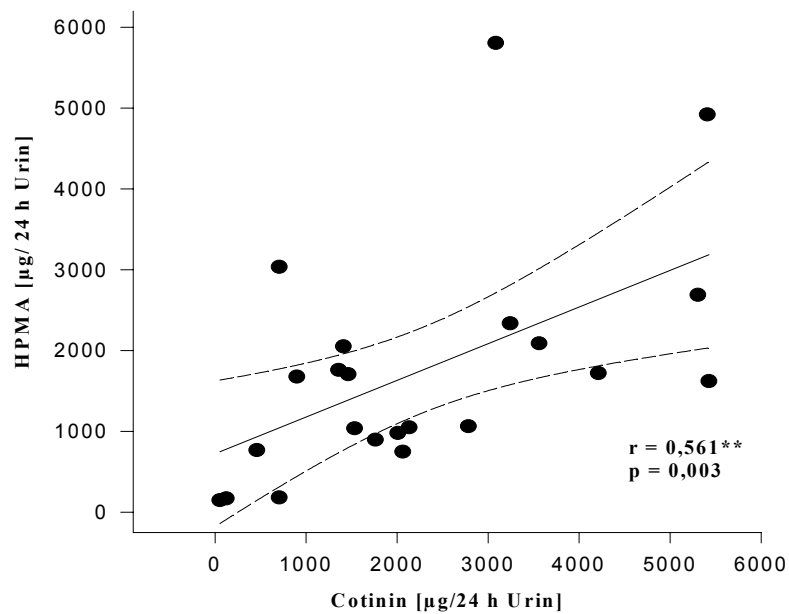


Abb. 4.47: Korrelation HPMA vs. Cotinin im Urin (Raucher, N = 25)

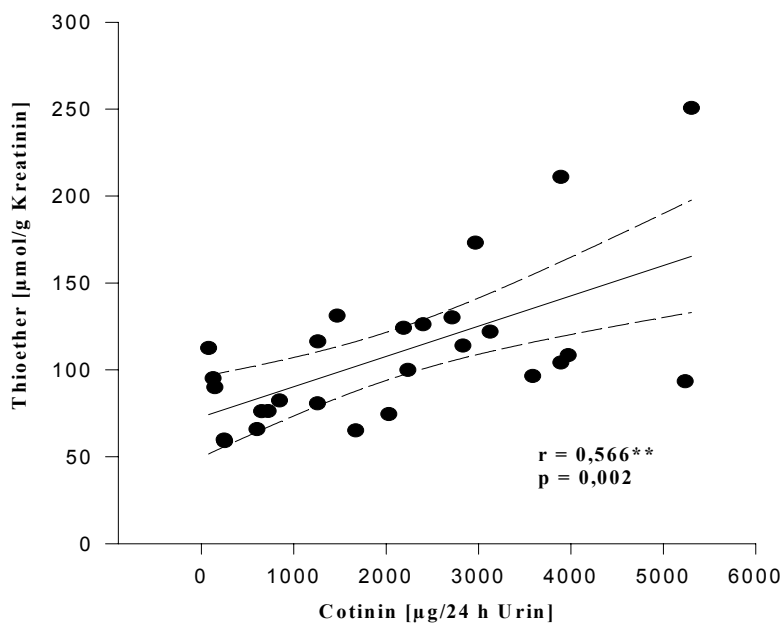


Abb. 4.48: Korrelation Thioether vs. Cotinin im Urin (Raucher, N = 27)

Interessant ist ferner, dass sich mit den untersuchten Biomarkern signifikante Korrelationen zu der Anzahl gerauchter Zigaretten/Tag herstellen lassen. Neben den erwarteten Signifikanzen bei MeVal, HyEtVal und den Thioethern ist der hoch signifikante Zusammenhang zwischen CyEtVal bzw. HPMA und der Zigarettenzahl pro Tag interessant (Abb. 4.49 und 4.50).

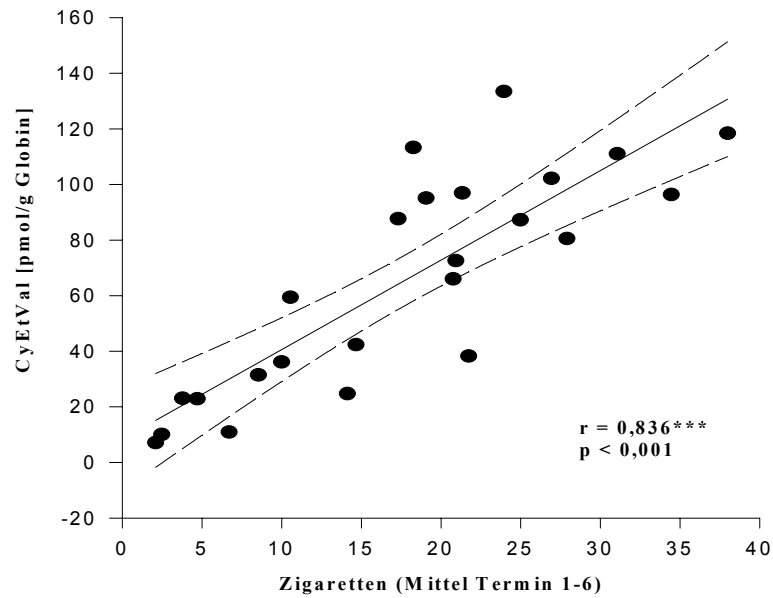


Abb. 4.49: Korrelation CyEtVal vs. gerauchte Zigaretten (N = 24)

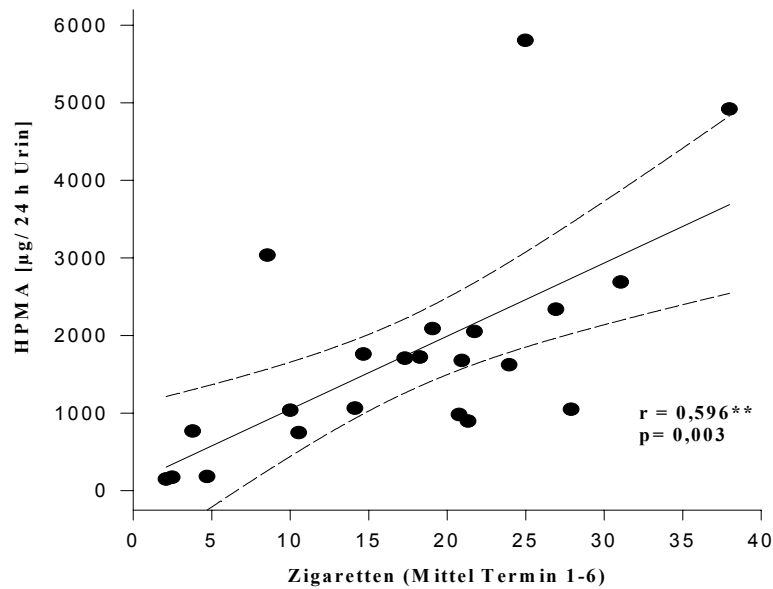


Abb. 4.50: Korrelation HPMA vs. gerauchte Zigaretten (N = 23)

Die 3-Alkyladenin-Addukte korrelieren signifikant mit Cotinin im Urin (Abb. 4.51 und 4.52).

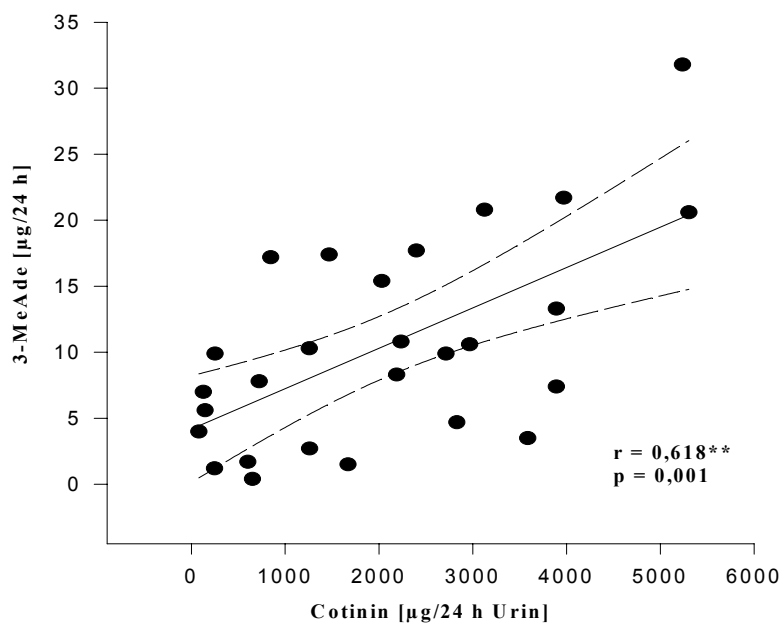


Abb. 4.51: Korrelation 3-MeAde vs. Cotinin im Urin (Raucher, N = 27)

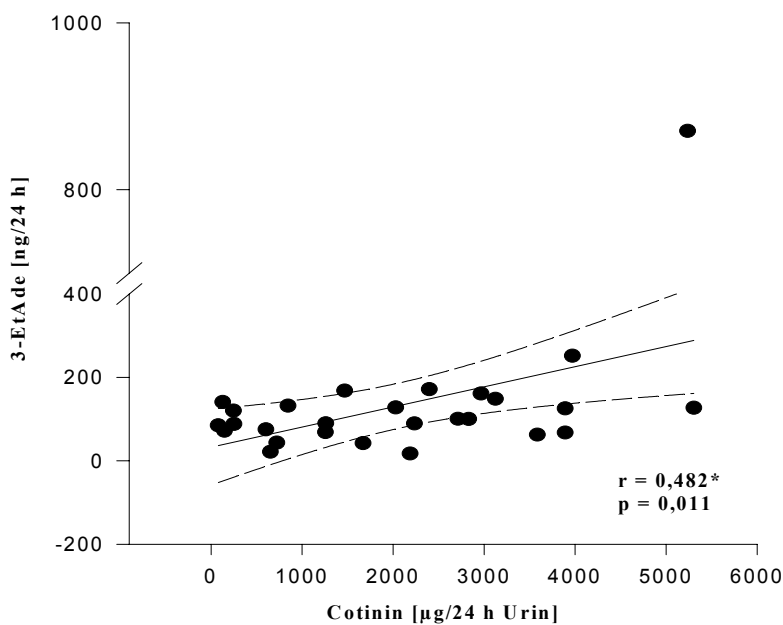


Abb. 4.52: Korrelation 3-EtAde vs. Cotinin im Urin (Raucher, N = 27)

Interessant ist, dass ein Proband die Extremwerte der DNA-Adduktrate sowohl bei 3-EtAde als auch bei 3-MeAde aufweist und gleichzeitig die höchsten Level der Cotininwerte im Urin

zeigt. Ein Zusammenhang der Addukte mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten lässt sich statistisch nicht belegen. Die Korrelation zwischen 3-MeAde und dem Zigarettenkonsum ist grenzwertig signifikant ($r = 0,398$, $p = 0,054$). Zwischen 3-EtAde und dem Zigarettenkonsum besteht kein Zusammenhang ($r = 0,250$, $p = 0,240$). Auch zu den Thiocyanatwerten besteht keine statistisch signifikante Korrelation (3-MeAde $r = 0,307$, $p = 0,120$; 3-EtAde $r = 0,282$, $p = 0,154$).

In Tabelle 4.35 sind die Korrelationen zwischen den gemessenen Alkyl-Biomarkern und den Markern der Tabakrauchexposition zusammenfassend dargestellt. Grau unterlegte Felder zeigen Signifikanz an.

Tab. 4.35: Korrelationen der gemessenen Biomarker mit Markern der Tabakrauchexposition gemittelt über alle 6 Termine (Raucher, $N = 27$)

<i>Alkyl-Biomarker (Termin 6)</i>	<i>Zigaretten</i>	<i>Cotinin</i>	<i>Cotinin</i>	<i>Thiocyanat</i>
	[Tag]	[Urin]	[Plasma]	[Plasma]
MeVal (LLE)	0,466 ^a	0,454*	0,519**	0,469*
EtVal (LLE)	-0,104	-0,233	-0,240	-0,374
HyEtVal (LLE)	0,534**	0,644***	0,462*	0,429*
CyEtVal (LLE)	0,836***	0,895***	0,814***	0,777***
MeVal (SPE)	0,537**	0,536**	0,530*	0,464
EtVal (SPE)	0,255	0,081	0,108	0,056
CyEtVal (SPE)	0,669***	0,771***	0,632***	0,702***
MMA	0,530**	0,617**	0,409*	0,371
EMA	0,301	0,300	0,156	0,266
HPMA	0,596**	0,561**	0,459*	0,273
CEMA	0,124	0,286	0,087	0,198
HEMA	0,130	0,084	0,032	0,194
Thioether	0,656***	0,615**	0,645***	0,520**
3-MeAde	0,398	0,618**	0,494**	0,307
3-EtAde	0,250	0,482*	0,196	0,282

a: * Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,05$ (2-seitig) signifikant. ** Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,01$ (2-seitig) signifikant. *** Korrelation ist auf dem Niveau von $p < 0,001$ (2-seitig) signifikant

4.5.1.2 Nichtrauchergruppe

Die Tabakrauchbelastung der Nichtraucher wird mit eigenen Angaben der ETS-Belastung (Dauer und Grad der Exposition), mit Nikotinmessungen auf Personalsamplern, mit Cotinin im Plasma und Urin und Thiocyanat im Plasma ermittelt. Die Korrelationen zwischen den Indikatoren der Tabakrauchbelastung und den Alkyl-Biomarkern ist in Tabelle 4.36 zusammengefasst. Grau unterlegte Felder zeigen statistisch signifikante Zusammenhänge an.

Tab. 4.36: Korrelationen der gemessenen Biomarker mit Markern der Tabakrauchexposition gemittelt über alle 6 Termine (Nichtraucher, N = 42)

<i>Alkyl-Biomarker (Termin 6)</i>	<i>ETS-Stunden</i>	<i>Nikotin</i>	<i>Cotinin</i>	<i>Cotinin</i>	<i>Thiocyanat</i>
	<i>[Tag]</i>	<i>[$\mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft]</i>	<i>[Urin]</i>	<i>[Plasma]</i>	<i>[Plasma]</i>
MeVal (LLE)	0,094	0,129	0,469*** ^a	0,008	0,041
EtVal (LLE)	-0,131	-0,003	-0,059	0,203	-0,214
HyEtVal (LLE)	0,009	-0,205	0,097	-0,109	-0,154
CyEtVal (LLE)	-0,069	0,150	0,116	0,030	-0,066
MeVal (SPE)	0,273	0,161	0,280	0,154	-0,328*
EtVal (SPE)	-0,140	0,144	-0,019	0,095	0,256
CyEtVal (SPE)	0,060	0,347*	0,125	0,707**	-0,155
MMA	0,041	-0,103	0,118	-0,067	0,190
EMA	-0,031	-0,109	0,009	0,048	0,174
HPMA	-0,004	-0,004	0,137	-0,062	0,207
CEMA	-0,128	0,057	0,029	0,022	0,214
HEMA	0,109	-0,045	0,088	-0,118	0,351*
Thioether	-0,090	0,002	0,138	-0,135	-0,050
3-MeAde	-0,117	-0,180	-0,211	-0,124	0,134
3-EtAde	-0,077	-0,043	-0,123	-0,138	0,069

a: * Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,05$ (2-seitig) signifikant. ** Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,01$ (2-seitig) signifikant. *** Korrelation ist auf dem Niveau von $p < 0,001$ (2-seitig) signifikant

Die Hämoglobinaddukte zeigen bei Aufarbeitung nach Methode 3.4.5.4.2 außer einer hochsignifikanten Korrelation zwischen MeVal und Cotinin im Urin und zwischen CyEtVal (nach 3.4.5.4.1) und den Nikotinwerten auf Personalsamplern (Abb. 4.53) keine statistisch relevanten Zusammenhänge zur Tabakrauchexposition. Allerdings ist der gemessene

Cotininwert im Urin eines Probanden mit $> 100 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ so hoch (sowohl für Methode LLE als auch SPE (Abb. 4.54, 4.55)), dass nach Ausschluss des Probanden ein signifikanter Zusammenhang zu den CyEtVal-Addukten besteht. Dies gilt auch dann, wenn man die Gruppen Nichtraucher und Passivraucher getrennt voneinander betrachtet. Bei Anwendung der neu entwickelten Methode werden für CyEtVal Korrelationen mit Cotinin im Plasma gefunden (Abb. 4.56), die hoch signifikant sind, sowie mit den Nikotinmessungen. Die lineare Abhängigkeit ist bei Exkludierung des oben genannten Falles auch für die Cotininwerte in Urin gegeben.

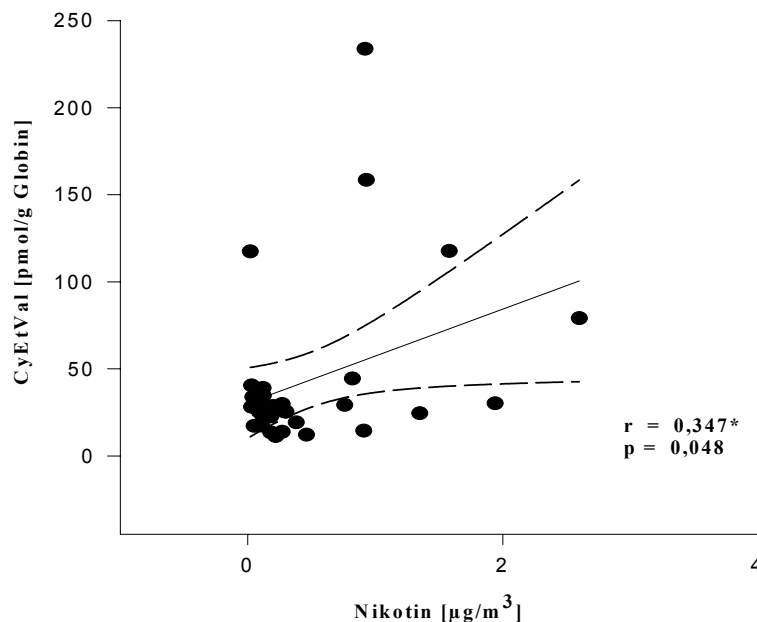


Abb. 4.53: Korrelation CyEtVal vs. Nikotin auf Personalsampler (Nichtraucher, N = 41)

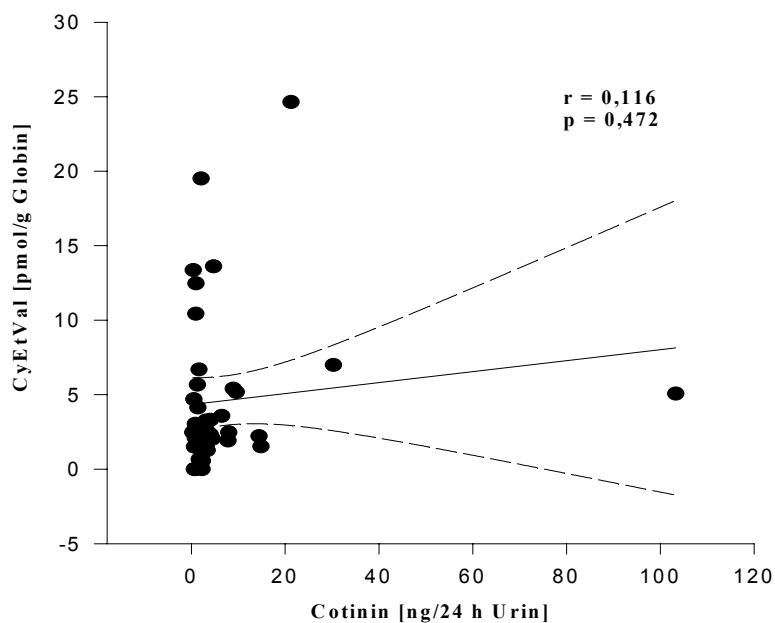


Abb. 4.54: Korrelation CyEtVal vs. Cotinin im Urin (Nichtraucher, LLE, N = 41)

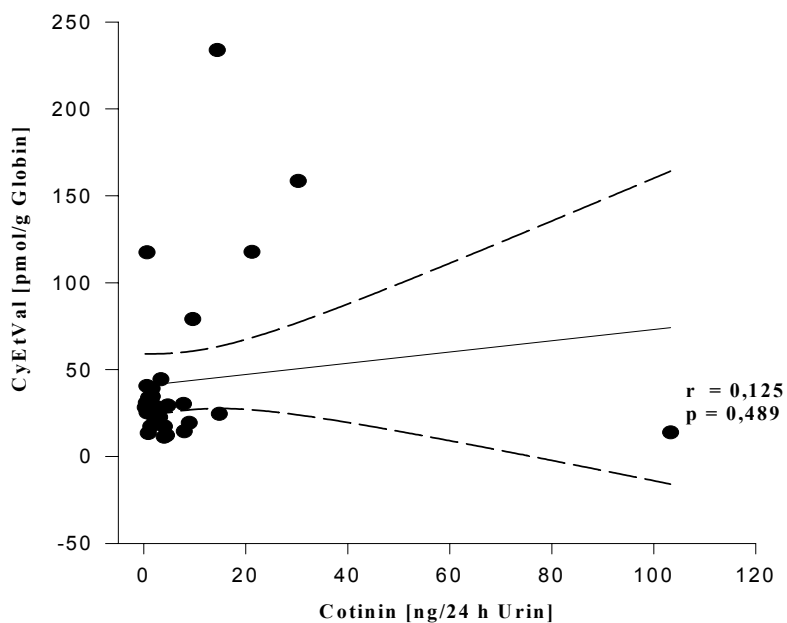


Abb. 4.55: Korrelation CyEtVal vs. Cotinin im Urin (Nichtraucher, SPE, N = 42)

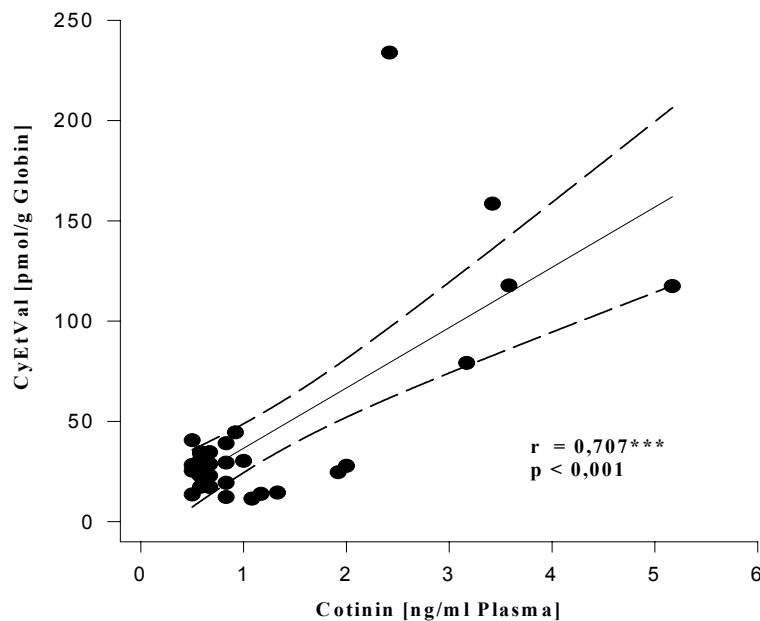


Abb. 4.56: Korrelation CyEtVal vs. Cotinin im Plasma (Nichtraucher, SPE, N = 37)

Die Mercaptursäuren, Thioether und die Alkyladenine zeigen bis auf eine schwache Korrelation zw. HEMA und Thiocyanat keinen signifikanten Zusammenhang mit der Tabakrauchexposition bei Nichtrauchern an.

4.5.2 Zusammenhang zur Ernährung

4.5.2.1 Rauchergruppe

Für die Gruppe der Raucher lassen sich die gemessenen Biomarker nur bedingt mit der Ernährung in Zusammenhang bringen, werden doch eventuelle Auswirkungen der Ernährungsgewohnheiten durch das Aktivrauchen überdeckt. Dennoch sind bei einigen der erfassten Parameter Zusammenhänge erkennbar. Für den Kaffeekonsum lassen sich hochsignifikante bzw. signifikante Zusammenhänge herstellen mit MeVal ($r = 0,409$, $p = 0,034$), HyEtVal ($r = 0,471$, $p = 0,013$), CyEtVal ($r = 0,586$, $p = 0,001$) sowie den Mercaptursäuren MMA ($r = 0,789$, $p < 0,0001$) und EMA ($r = 0,496$, $p = 0,010$). Auch die Alkyladenine zeigen Zusammenhänge mit der aufgenommenen Kaffeemenge (3-EtAde $r = 0,396$, $p = 0,041$, allerdings nur die Protokolle des 6. Termins berücksichtigt; 3-MeAde $r = 0,465$, $p = 0,014$; 6. Termin ebenfalls signifikant $r = 0,457$, $p = 0,017$), nicht jedoch mit dem

Teekonsum (3-EtAde $r = -0,056$, $p = 0,781$; 3-MeAde $r = -0,077$, $p = 0,702$). Der Teekonsum kann, wenn man nur die Ernährungsprotokolle des 6. Termins berücksichtigt, mit 2 Biomarkern in Verbindung gebracht werden. So ergibt sich eine Korrelation mit MeVal ($r = 0,445$, $p = 0,020$) und HEMA ($r = 0,459$, $p = 0,018$). Bei dieser Gruppe lässt sich ein Einfluss des Fischkonsums auf das EtVal-Addukt messen ($r = 0,386$, $p = 0,047$), wobei das Signifikanzniveau nicht hoch ist.

4.5.2.2 Nichtrauchergruppe

Die Nichtraucher zeigen etwas deutlichere Einflüsse der Nahrungsgewohnheiten auf die Alkyl-Biomarker. Die Korrelationen sind in Tabelle 4.37 zusammengefasst.

Tab. 4.37: Korrelation der gemessenen Biomarker mit der Ernährung (Nichtraucher, N = 42)

<i>Alkyl-Biomarker</i>	<i>Tee</i>	<i>Kaffee</i>	<i>Fleisch/Wurst</i>	<i>Fisch</i>	<i>Gemüse</i>	<i>Obst</i>
MeVal (LLE)	0,037	-0,025	-0,140	0,468* ^a	0,024	0,135
EtVal (LLE)	0,010	-0,132	0,325*	-0,116	-0,216	0,183
HyEtVal (LLE)	0,343*	-0,028	-0,190	0,371*	-0,116	0,084
CyEtVal (LLE)	0,171	0,008	0,010	-0,048	-0,339*	0,190
MeVal (SPE)	-0,038	-0,004	0,124	0,041	-0,100	-0,276
EtVal (SPE)	0,283	0,127	0,007	0,190	0,171	0,212
CyEtVal (SPE)	0,120	0,043	0,126	-0,039	-0,112	0,072
MMA	-0,056	0,287	0,039	0,320*	0,277	0,336*
EMA	-0,276	0,598***	0,022	0,072	-0,019	-0,109
HPMA	-0,099	-0,127	0,379*	0,036	0,139	0,057
CEMA	-0,075	-0,065	-0,017	0,154	0,193	0,215
HEMA	-0,119	0,136	0,020	0,067	0,092	-0,004
Thioether	-0,082	0,037	-0,183	0,294	0,227	0,007
3-MeAde	0,090	0,179	-0,168	0,039	0,171	-0,276
3-EtAde	-0,177	0,109	-0,139	0,090	0,271	-0,117

a: * Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,05$ (2-seitig) signifikant. ** Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,01$ (2-seitig) signifikant. *** Korrelation ist auf dem Niveau von $p < 0,001$ (2-seitig) signifikant

4.5.3 Zusammenhang mit genetischen Polymorphismen

Der Einfluss der genetischen Polymorphismen auf die Biomarker, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, soll an den beiden Gruppen Rauchern und Nichtrauchern getrennt untersucht werden. Träger des GSTM1-Wildtyps verfügen über das Enzym Glutathion-S-Transferase, während die Mutante, der Null-Genotyp, defizient dafür ist.

4.5.3.1 Rauchergruppe

Einen Überblick über die Korrelationen mit den genetischen Polymorphismen für die Gruppe der Raucher gibt Tab. 4.38. Die Werte geben die MW \pm STABW an, Zahlen in Klammern die Anzahl der Probanden mit dem entsprechenden Genotyp.

Tab. 4.38: Genetische Polymorphismen und Biomarker der PAH 96-Studie bei Rauchern

<i>Alkyl-Biomarker</i>	<i>GST M1</i>		<i>GST T1</i>		<i>GSTT1 M1</i>	
	<i>Wildtyp</i>	<i>Mutante (0/0)</i>	<i>Wildtyp</i>	<i>Mutante (0/0)</i>	<i>T1 und M1 Wildtyp</i>	<i>T1 + M1 deletiert</i>
MeVal (LLE)	332 \pm 39 (11)	383 \pm 35 (16)	327 \pm 21 (21)	486 \pm 75 (6)**	369 \pm 32 (16)	526 \pm 114 (3)*
EtVal (LLE)	112 \pm 7 (11)	111 \pm 9 (16)	105 \pm 6 (21)	133 \pm 13 (6)*	110 \pm 8 (16)	137 \pm 27 (3)
HyEtVal (LLE)	202 \pm 60 (11)	174 \pm 30 (16)	174 \pm 34 (21)	227 \pm 64 (6)	189 \pm 36 (16)	186 \pm 57 (3)
CyEtVal (LLE)	63 \pm 14 (11)	61 \pm 8 (16)	64 \pm 9 (21)	56 \pm 14 (6)	57 \pm 8 (16)	66 \pm 22 (3)
MeVal (SPE)	467 \pm 35 (11)	506 \pm 42 (16)	458 \pm 20 (21)	604 \pm 101 (6)**	480 \pm 29 (16)	672 \pm 184 (3)*
EtVal (SPE)	44 \pm 5 (11)	46 \pm 5 (16)	45 \pm 5 (21)	46 \pm 7 (6)	48 \pm 6 (16)	40 \pm 8 (3)
CyEtVal (SPE)	230 \pm 33 (11)	175 \pm 21 (16)	208 \pm 22 (21)	160 \pm 30 (6)*	166 \pm 22 (16)	184 \pm 37 (3)
MMA	94 \pm 13 (11)	61 \pm 7 (15)*	73 \pm 9 (20)	82 \pm 12 (6)	65 \pm 7 (15)	72 \pm 20 (3)
EMA	17 \pm 4 (11)	13 \pm 2 (15)	15 \pm 3 (20)	14 \pm 3 (6)	14 \pm 2 (15)	13 \pm 5 (3)
HPMA	2372 \pm 513 (11)	1182 \pm 184 (15)*	1643 \pm 251 (20)	1826 \pm 835 (6)	1470 \pm 349 (15)	1107 \pm 551 (3)
CEMA	2089 \pm 238 (11)	1701 \pm 209 (15)	1820 \pm 163 (20)	2014 \pm 448 (6)	1521 \pm 117 (15)	2465 \pm 864 (3)*
HEMA	554 \pm 118 (11)	544 \pm 121 (15)	606 \pm 105 (20)	357 \pm 67 (6)	552 \pm 119 (15)	338 \pm 130 (3)
Thioether	109 \pm 15 (11)	109 \pm 11 (16)	113 \pm 11 (21)	95 \pm 9 (6)*	106 \pm 11 (16)	104 \pm 14 (3)
3-MeAde	13 \pm 9 (11)	9 \pm 6 (16)	10 \pm 8 (21)	12 \pm 9 (6)	10 \pm 6 (16)	9 \pm 11 (3)
3-EtAde	182 \pm 235 (11)	98 \pm 49 (11)	137 \pm 173 (21)	116 \pm 83 (6)	108 \pm 60 (16)	90 \pm 64 (3)

a: * Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,05$ (2-seitig) signifikant. ** Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,01$ (2-seitig) signifikant. *** Korrelation ist auf dem Niveau von $p < 0,001$ (2-seitig) signifikant

4.5.3.2 Nichtrauchergruppe

Die Ergebnisse der genetischen Einflüsse auf Biomarker der Tabakrauchexposition bei Nichtrauchern sind in Tab. 4.39 zusammengestellt.

Tab. 4.39: Genetische Polymorphismen und Biomarker der PAH 96-Studie bei Nichtrauchern

<i>Alkyl-Biomarker</i>	<i>GST M1</i>		<i>GST T1</i>		<i>GSTT1 M1</i>	
	<i>Wildtyp</i>	<i>Mutante (0/0)</i>	<i>Wildtyp</i>	<i>Mutante (0/0)</i>	<i>T1 und M1 Wildtyp</i>	<i>T1 + M1 Deletiert</i>
MeVal (LLE)	249 ± 5 (26)	270 ± 12 (15)*	250 ± 5 (34)	291 ± 17 (7)**	254 ± 10 (14)	316 ± 15 (4)**
EtVal (LLE)	120 ± 6 (26)	103 ± 5 (15)*	115 ± 5 (34)	106 ± 7 (7)	104 ± 5 (14)	105 ± 12 (4)
HyEtVal (LLE)	61 ± 19 (26)	65 ± 19 (15)	61 ± 15 (34)	72 ± 37 (7)	41 ± 10 (14)	113 ± 59 (4)
CyEtVal (LLE)	5 ± 1 (26)	3 ± 1 (15)	5 ± 1 (34)	3 ± 1 (7)	4 ± 1 (14)	4 ± 1 (4)
MeVal (SPE)	347 ± 12 (27)	355 ± 13 (15)	338 ± 9 (35)	409 ± 16 (7)**	354 ± 15 (14)	405 ± 20 (4)**
EtVal (SPE)	45 ± 5 (25)	40 ± 5 (13)	41 ± 3 (33)	54 ± 15 (7)*	49 ± 8 (14)	35 ± 5 (4)
CyEtVal (SPE)	57 ± 13 (20)	22 ± 2 (13)	43 ± 10 (26)	46 ± 14 (7)	37 ± 9 (12)	21 ± 3 (4)
MMA	57 ± 7 (26)	76 ± 10 (15)	64 ± 6 (34)	62 ± 16 (7)	66 ± 11 (14)	80 ± 24 (4)
EMA	14 ± 2 (26)	11 ± 2 (15)	14 ± 2 (34)	9 ± 2 (7)**	11 ± 2 (14)	11 ± 2 (4)
HPMA	548 ± 99 (26)	838 ± 191 (15)	670 ± 112 (34)	573 ± 132 (7)	798 ± 207 (14)	675 ± 192 (4)
CEMA	1427 ± 135 (26)	1713 ± 219 (15)	1546 ± 120 (34)	1461 ± 391 (7)	1536 ± 194 (14)	1802 ± 632 (4)
HEMA	480 ± 92 (26)	1081 ± 377 (15)*	691 ± 180 (34)	742 ± 234 (7)	958 ± 406 (14)	498 ± 325 (4)
Thioether	68 ± 3 (26)	68 ± 4 (15)	67 ± 3 (34)	75 ± 10 (7)	70 ± 6 (14)	72 ± 10 (4)
3-MeAde	5 ± 5 (26)	3 ± 3 (15)	5 ± 4 (34)	3 ± 2 (7)	4 ± 3 (14)	2 ± 2 (4)
3-EtAde	34 ± 48 (26)	38 ± 41 (15)	38 ± 48 (34)	27 ± 30 (7)	29 ± 42 (14)	44 ± 29 (4)

a: * Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,05$ (2-seitig) signifikant. ** Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,01$ (2-seitig) signifikant. *** Korrelation ist auf dem Niveau von $p < 0,001$ (2-seitig) signifikant

4.5.4 Korrelationen der Biomarker untereinander

Abschließende Ergebnisse fassen die möglichen Korrelationen der Biomarker untereinander zusammen, getrennt nach Rauchern und Nichtrauchern.

4.5.4.1 Rauchergruppe

Die klassischen Biomarker der Rauchexposition (Cotinin im Plasma und Urin, Thiocyanat) korrelieren erwartungsgemäß untereinander mit hoher Signifikanz (in allen Fällen $p < 0,001$). Bei den Rauchern ergeben sich hoch signifikante Korrelationen der mit den beiden angewandten Hämoglobinaddukt-Methoden gemessenen Valinaddukte untereinander, und zwar sowohl beim direkten Vergleich der identischen Analyten (Tab. 4.11, Abschnitt 4.1.3) als auch zwischen den unterschiedlichen Hämoglobinaddukten. Die Mercaptursäuren zeigen ähnlich gute Korrelationen untereinander und zu den Hämoglobinaddukten (Tab. 4.40).

Tab. 4.40: Korrelationen der Biomarker untereinander: Raucher der PAH-Studie

<i>Analyt</i>	<i>MeVal^b</i>	<i>EtVal^b</i>	<i>CyEtVal^b</i>	<i>HyEtVal^c</i>	<i>CyEtVal^c</i>	<i>MMA</i>	<i>EMA</i>	<i>HPMA</i>	<i>CEMA</i>	<i>HEMA</i>	<i>TE^d</i>	<i>3-MeAde</i>
MeVal ^b												
EtVal ^b	-0,006											
CyEtVal ^b	0,469*	0,027										
HyEtVal ^c	0,506**	0,108	0,442*									
CyEtVal ^c	0,535**	0,041	0,841***	0,605**								
MMA	0,264	0,046	0,543**	0,475*	0,504**							
EMA	0,259	0,015	0,418*	0,560**	0,328	0,559**						
HPMA	0,326	0,288	0,522**	0,317	0,472*	0,516**	0,222					
CEMA	0,041	-0,312	0,293	0,260	0,255	0,510**	0,196	0,067				
HEMA	0,039	-0,090	0,311	0,076	0,224	-0,121	-0,190	-0,016	-0,037			
Thioether	0,375	0,399*	0,654***	0,259	0,617**	0,475*	0,124	0,452*	-0,060	0,312		
3-MeAde	0,346	0,041	0,451*	0,608**	0,544**	0,594**	0,481*	0,543**	0,195	-0,146	0,432*	
3-EtAde	0,269	-0,169	0,450*	0,661***	0,455*	0,424*	0,683**	0,187	0,283	-0,033	0,043	0,717***

a: * Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,05$ (2-seitig) signifikant. ** Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,01$ (2-seitig) signifikant. *** Korrelation ist auf dem Niveau von $p < 0,001$ (2-seitig) signifikant

b: Aufarbeitung mit SPE-Methode

c: Aufarbeitung mit LLE-Methode

d: Thioether

In den Abb. 4.57 bis 4.65 sind die hoch signifikanten Korrelationen zwischen verschiedenen Markern graphisch dargestellt.

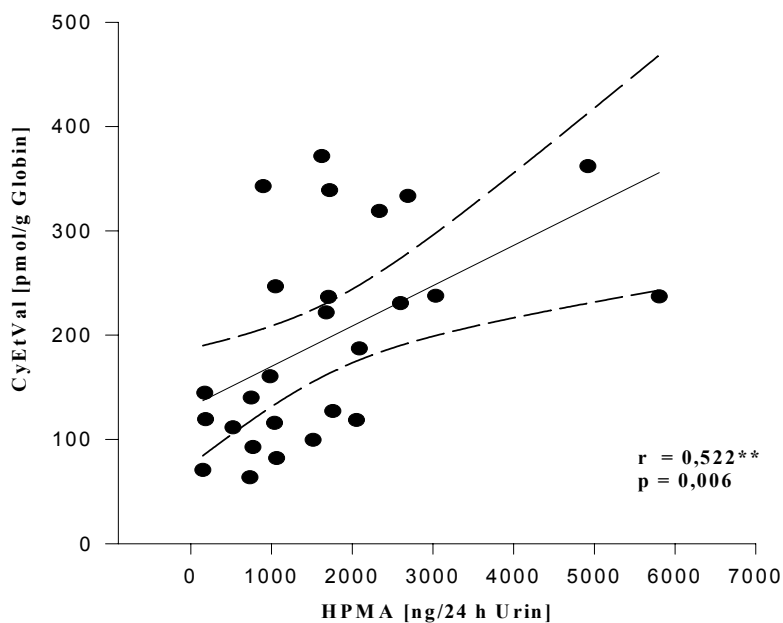


Abb. 4.57: Korrelation CyEtVal vs. HPMA (Raucher, N = 27)

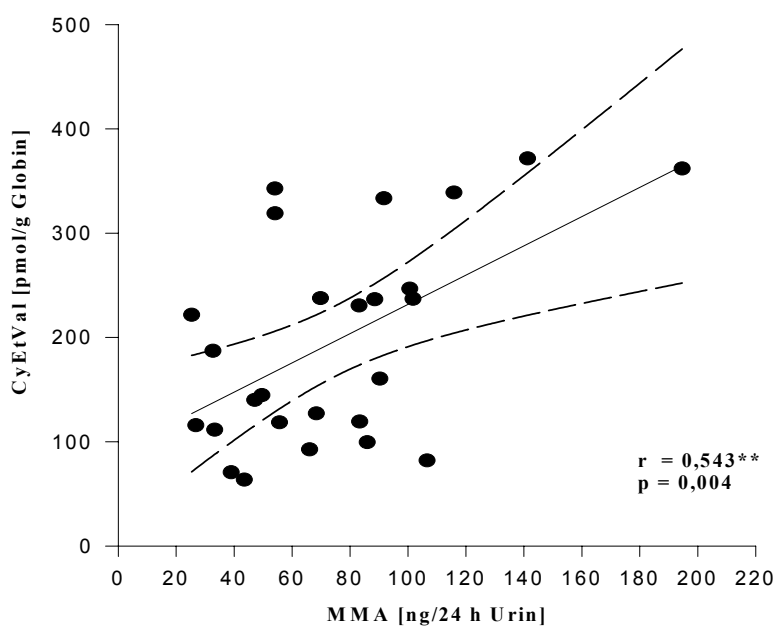


Abb. 4.58: Korrelation CyEtVal vs. MMA (Raucher, N = 27)

Neben den sehr guten Korrelationen zu den Mercaptursäuren ist auch ein Zusammenhang zur Thioether-Gesamtausscheidung festzustellen.

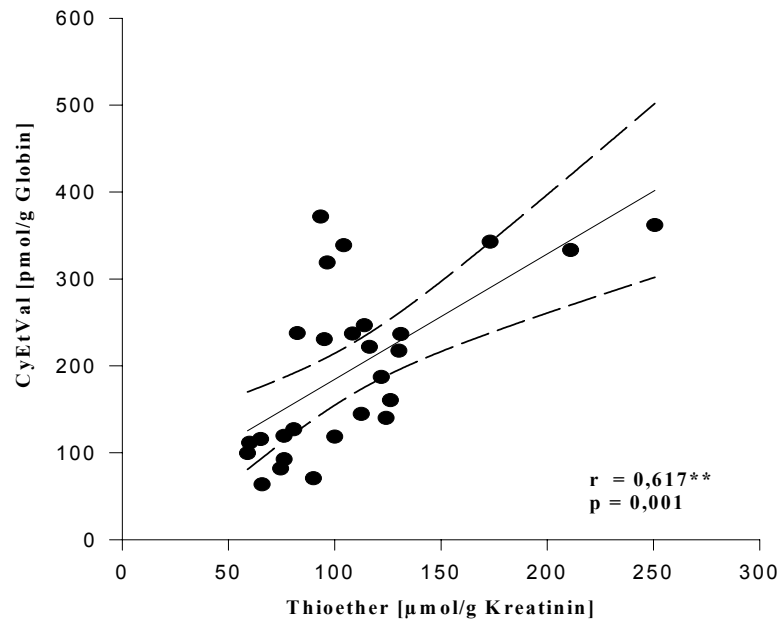


Abb. 4.59: Korrelation CyEtVal vs. Thioether (Raucher, N = 27)

Die Mercaptursäuren MMA und HPMA korrelieren ebenfalls mit der Thioetherausscheidung, wenn auch nicht mit so hoher Signifikanz (Abb. 4.60 und 4.61).

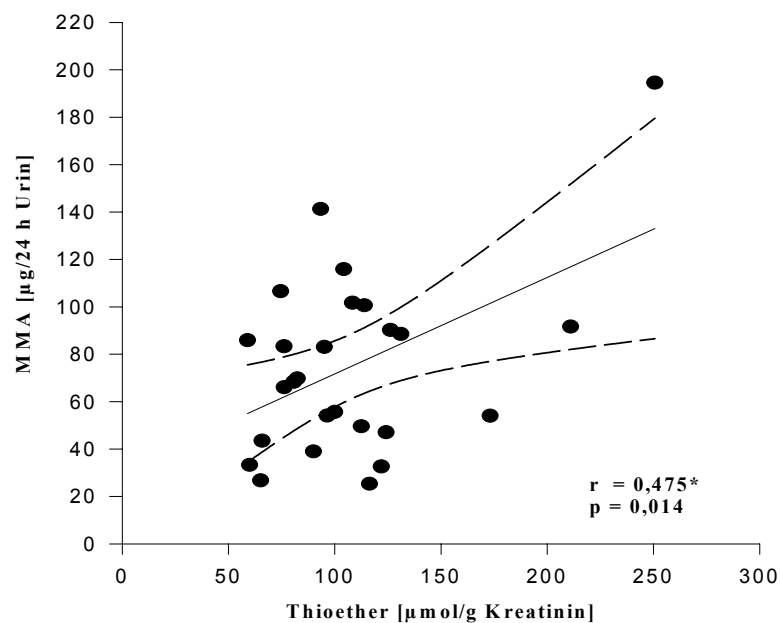


Abb. 4.60: Korrelation MMA vs. Thioether (Raucher, N = 27)

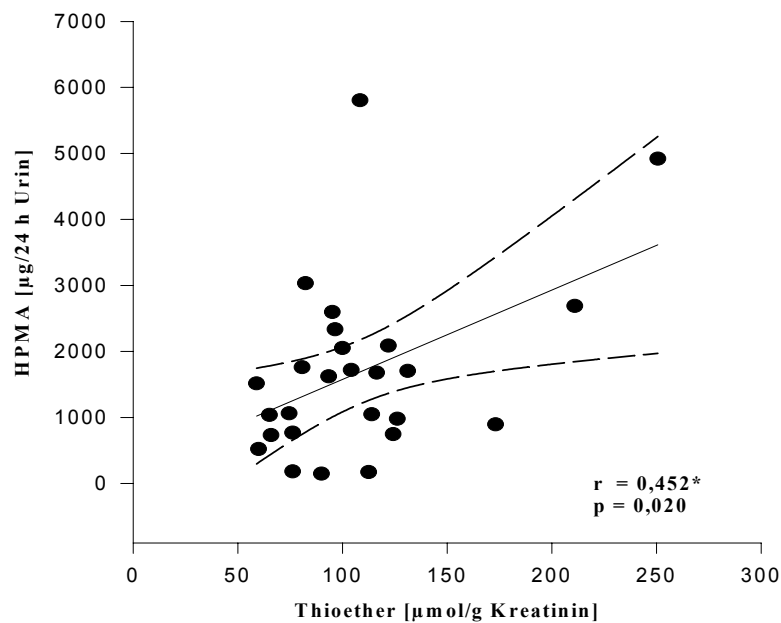


Abb. 4.61: Korrelation HPMA vs. Thioether (Raucher, N = 26)

Die DNA-Alkyladdukte zeigen zu ihren korrespondierenden alkylierten Mercaptursäuren hochsignifikante Korrelationen (Abb. 4.62, 4.63), 3-MeAde korreliert außerdem mit EMA, HPMA und der Thioetherausscheidung. 3-EtAde korreliert mit MMA ($p = 0,031$), mit CEMA und HEMA sind jedoch ebenso wenig statistisch signifikante Zusammenhänge herzustellen wie bei 3-MeAde. Mit den korrespondierenden Alkylvalinaddukten sind keine signifikanten Zusammenhänge festzustellen. 3-MeAde und MeVal korrelieren grenzwertig miteinander ($r = 0,346$, $p = 0,077$; Abb. 4.64). Zwischen 3-EtAde und EtVal besteht kein Zusammenhang, selbst dann nicht, wenn man die Ergebnisse beider Hb-Adduktmethoden zur Berechnung heranzieht (LLE: $r = -0,087$, $p = 0,666$; SPE: $r = -0,169$, $p = 0,399$). Zu den HyEtVal-Addukten bestehen bei beiden DNA-Addukten hochsignifikante Korrelationen (3-MeAde $r = 0,608$, $p = 0,001$; 3-EtAde $r = 0,661$, $p = 0,017$; Abb. 4.65). Zwischen den 3-Alkyladenin-addukten und CyEtVal bestehen signifikante Korrelationen (3-MeAde $p = 0,018$; 3-EtAde $p = 0,019$).

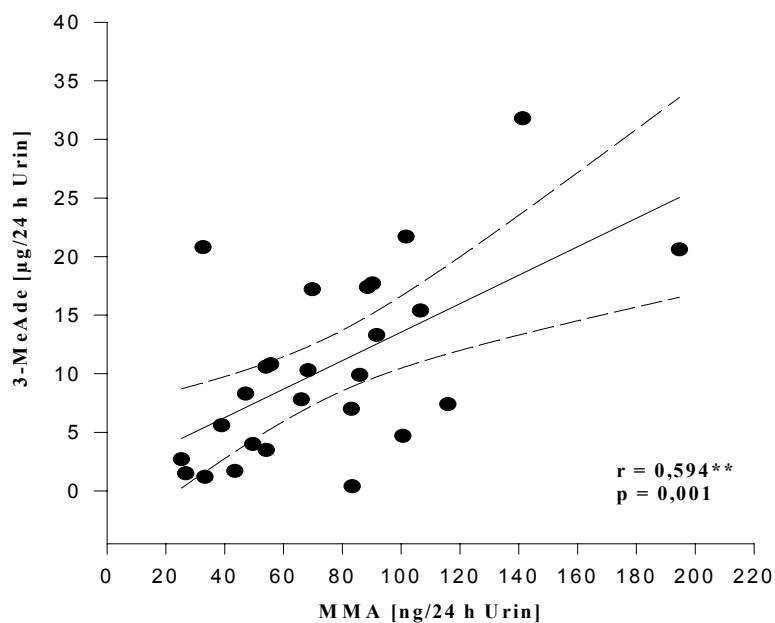


Abb. 4.62: Korrelation 3-MeAde vs. MMA (Raucher, N = 27)

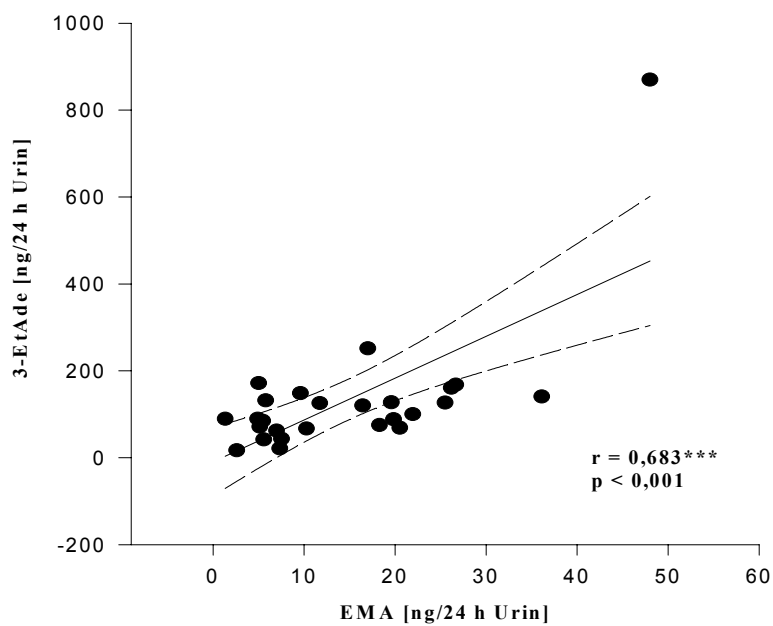


Abb. 4.63: Korrelation 3-EtAde vs. EMA (Raucher, N = 27)

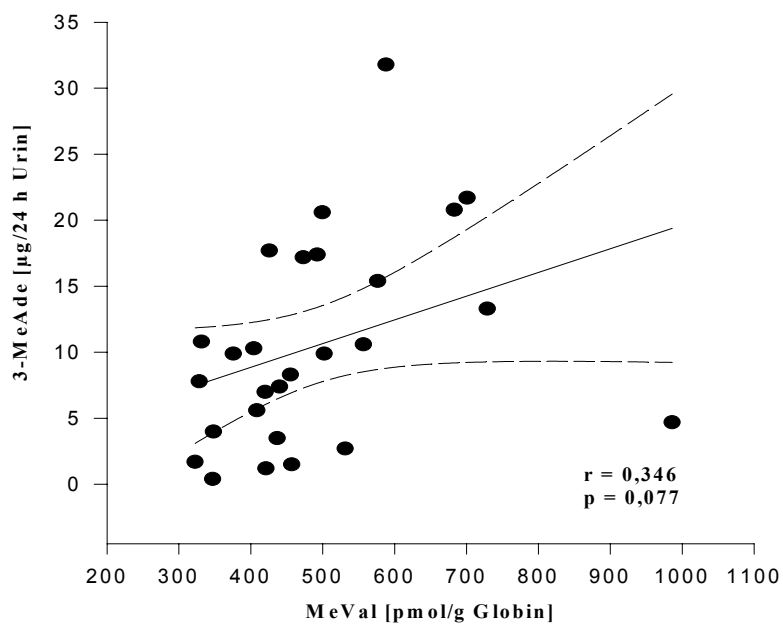


Abb. 4.64: Korrelation 3-MeAde vs. MeVal (Raucher, N = 27)

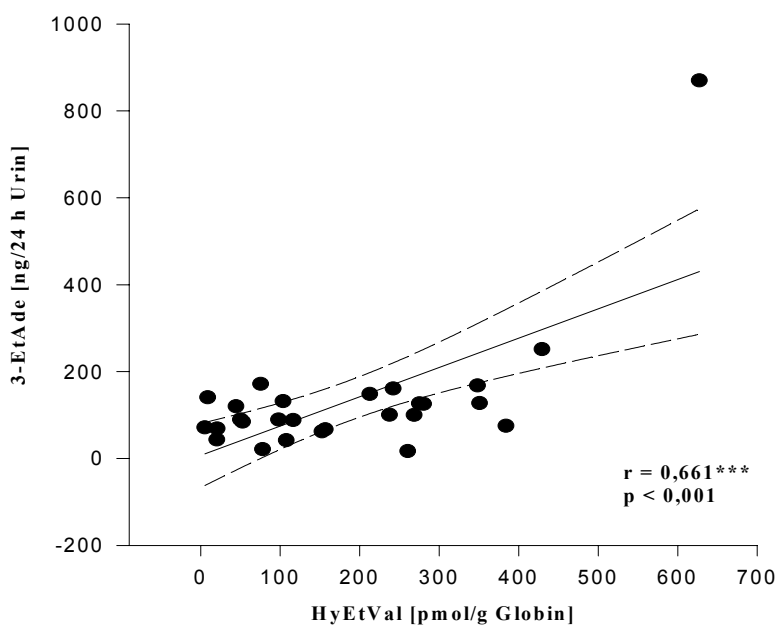


Abb. 4.65: Korrelation 3-EtAde vs. HyEtVal (Raucher, N = 27)

4.5.4.2 Nichtrauchergruppe

Die Biomarker der Tabakrauchexposition (Cotinin im Plasma und Urin, Thiocyanat) korrelieren untereinander nicht, wenn man die über alle 6 Termine gemittelten Werte zugrunde legt. Lediglich die von den Probanden angegebenen ETS-Stunden pro Tag zeigen einen Zusammenhang mit der gemessenen Konzentration an Cotinin im Urin ($r = 0,613^{**}$, $p < 0,0001$). Die Korrelation von Cotinin im Urin zu den Nikotinwerten auf Personalsamplern ist nicht signifikant ($r = 0,341$, $p = 0,029$). Cotinin im Plasma zeigt keine statistisch signifikanten Abhängigkeiten zu den beiden letztgenannten Markern. Korreliert man die Werte für den 6. Termin, ergeben sich für Cotinin im Plasma signifikante Zusammenhänge mit Cotinin im Urin ($r = 0,739$, $p = 0,001$), Nikotin auf Personalsampler ($r = 0,388$, $p = 0,012$), mit der ETS-Exposition ($r = 0,140$, $p = 0,383$) und Thiocyanat im Plasma ($r = 0,131$, $p = 0,413$). Cotinin im Urin korreliert mit allen Markern signifikant, mit Ausnahme von Thiocyanat im Plasma. Die Korrelationen der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Alkyl-Biomarker sind in Tabelle 4.41 zusammengefasst.

Tab. 4.41: Korrelationen der Biomarker untereinander: Nichtraucher der PAH-Studie

<i>Analyt</i>	<i>MeVal^a</i>	<i>EtVal^a</i>	<i>CyEtVal^a</i>	<i>HyEtVal^b</i>	<i>CyEtVal^b</i>	<i>MMA</i>	<i>EMA</i>	<i>HPMA</i>	<i>CEMA</i>	<i>HEMA</i>	<i>TE^c</i>	<i>3-MeAde</i>
MeVal ^a												
EtVal ^a	-0,104											
CyEtVal ^a	0,293	0,412*										
HyEtVal ^b	0,108	-0,112	-0,142									
CyEtVal ^b	0,020	-0,032	0,179	0,334*								
MMA	-0,148	-0,100	0,062	0,017	-0,142							
EMA	-0,268	-0,209	-0,200	-0,144	-0,100	0,401**						
HPMA	-0,053	0,028	0,078	-0,162	-0,248	0,453**	0,096					
CEMA	-0,226	-0,203	-0,162	-0,88	0,135	0,402**	0,153	0,190				
HEMA	-0,172	0,091	-0,204	-0,065	-0,238	0,549***	0,268	0,660***	0,155			
Thioether	0,108	0,004	-0,147	0,049	-0,138	0,141	0,018	0,327*	0,013	0,152		
3-MeAde	-0,020	-0,009	-0,137	0,171	-0,008	0,290	0,380*	-0,045	-0,081	0,276	-0,186	
3-EtAde	-0,124	-0,172	-0,266	-0,047	-0,033	0,424**	0,550***	0,061	0,248	0,326*	0,132	0,343*

a: * Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,05$ (2-seitig) signifikant. ** Korrelation ist auf dem Niveau von $p = 0,01$ (2-seitig) signifikant. *** Korrelation ist auf dem Niveau von $p < 0,001$ (2-seitig) signifikant

b: Aufarbeitung mit SPE-Methode

c: Aufarbeitung mit LLE-Methode

d: Thioether

Bei den Nichtrauchern besteht wie bei den Rauchern ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Gesamt-Thioetherausscheidung und HPMA (Abb. 4.66), nicht jedoch zwischen den Thioethern und den übrigen gemessenen Mercaptursäuren. Die in den jeweiligen Sammelmethode erfassten Analyten zeigen untereinander signifikante, zum Teil sogar hoch signifikante Korrelationen. Zwischen den Hb- und DNA-Addukten und den Mercaptursäuren lassen sich keine signifikanten Abhängigkeiten feststellen.

3-Ethyladenin zeigt eine hochsignifikante Korrelation zu der korrespondierenden Mercaptursäure. Signifikante Korrelationen bestehen des weiteren zu MMA und HEMA (Abb. 4.67), sowie zwischen 3-MeAde und EMA. Zu den entsprechenden Hämoglobinaddukten werden keine Korrelationen beobachtet.

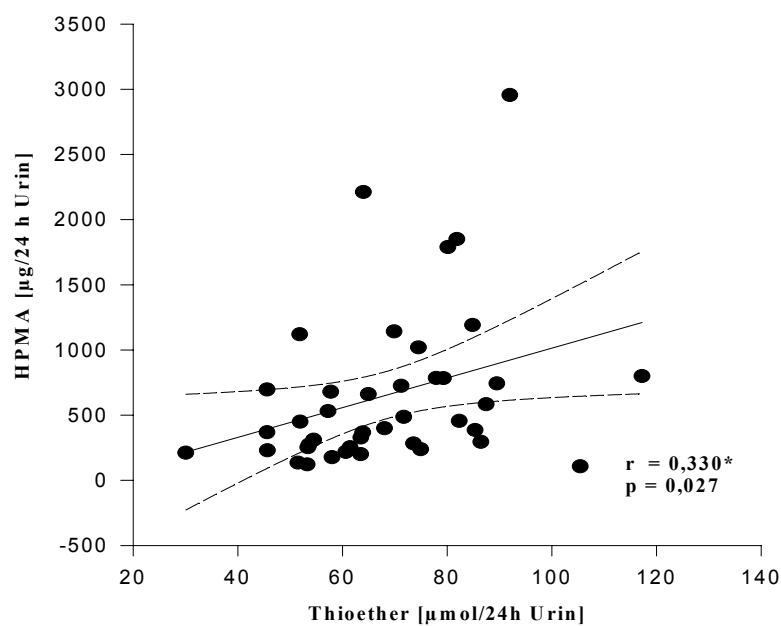


Abb. 4.66: Korrelation HPMA vs. Thioether (Nichtraucher, N = 42)

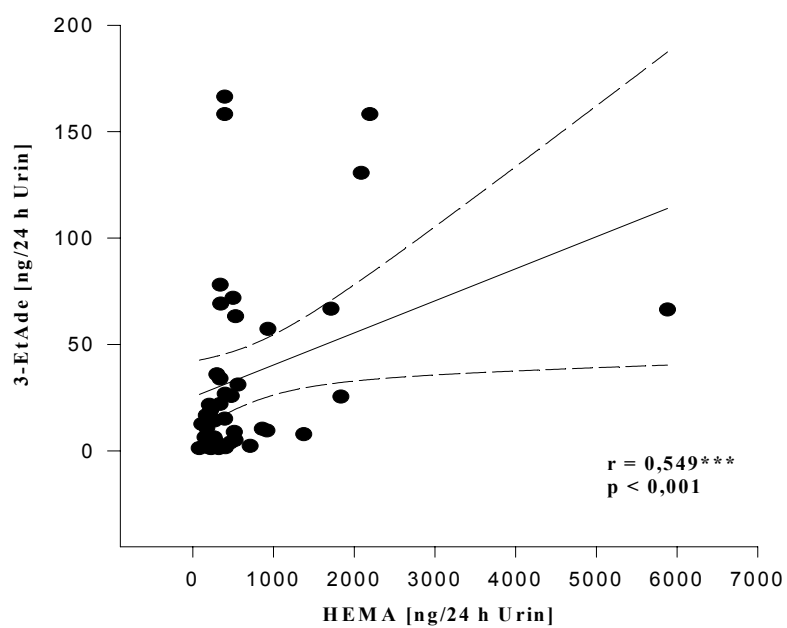


Abb. 4.67: Korrelation 3-EtAde vs. HEMA (Nichtraucher, N = 42)

5 Diskussion

5.1 Hämoglobinaddukte

5.1.1 Analytische Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten und weiterentwickelten Methoden gehen auf ein von Mowrer et al. beschriebenes Verfahren zurück [201]. In der Literatur finden sich viele verschiedene Modifikationen, die Änderungen hinsichtlich einer ganzen Reihe methodischer Parameter vorgenommen haben. So sind Extraktionsmittel, -volumen und -dauer variiert worden [117,187,188,190,196,203,258,259], ebenso der Einsatz interner Standards und Messsysteme [191,260]. Für HyEtVal liegen Ergebnisse eines Ringversuches vor, bei dem der modifizierte Edman-Abbau mit Ergebnissen einer Radioimmunoassay-Methode verglichen wird [261]. Zwischen den teilnehmenden Labors und den unterschiedlichen Methoden werden gute Korrelationen erzielt, allerdings im Bereich zwischen 10 – 100 pmol/g Globin mit Variationskoeffizienten von 28 %, wobei in jedem Labor nur jeweils ein Wert bestimmt werden konnte.

Aus Vollblut kann Globin nicht selektiv isoliert werden. Deshalb müssen intakte Erythrozyten vom Blutplasma abgetrennt werden. Im Blutplasma sind weitere Proteine enthalten, so dass die Abtrennung möglichst schnell nach der Blutabnahme erfolgen muss. Die Erythrozyten müssen mit Natriumchloridlösung gewaschen werden, um eventuell störende Proteine wie Serumalbumin abzutrennen, die andernfalls durch Ethylacetat mit ausgefällt werden, was zu einer verminderten Reinheit des Globins führt [262]. Auch eine teilweise Hämolyse liefert Falschbestimmungen in der Adduktanalyse. Die besten Ergebnisse werden mit frischen, nicht hämolysierten Vollblutproben erzielt. Der Adduktgehalt von isoliertem Globin ist bei –20 °C mindestens 12 Monate stabil. Wird die Aufreinigung so lange wiederholt, bis die Waschlösung klar ist, lässt sich das Globin in guter Qualität isolieren.

Vor der Derivatisierung ist unbedingt auf einen neutralen pH-Wert zu achten, da nur dann eine begrenzte Selektivität der Cyclisierungsreaktion für das addukttragende N-terminale Valin erreicht wird. Bei Einhaltung des pH-Werts wird die Cyclisierung zum Thiazolium-5-on-Kation erleichtert und damit die Cyclisierung alkylierter Valine begünstigt. Man sollte jedoch beachten, dass alle Reaktionen des Edman-Abbaus - mit Ausnahme der elektrophilen Addition zum Thiocarbamoylderivat - Gleichgewichtsreaktionen darstellen. Die Einhaltung des optimalen pH-Wertes ist daher von großer Bedeutung für die Reproduzierbarkeit der Methode.

Zur Kalibrierung werden Standardsubstanzen benötigt, in denen ein entsprechend modifiziertes Valin über eine Peptidbindung an mindestens eine weitere Aminosäure gebunden ist. Nur in diesem Falle entsprechen die pKs-Werte der Standards und damit die Derivatisierungsausbeuten denen der N-Alkyl-Valine des Globins [196]. Man könnte entsprechende Standards durch *in vitro*-Exposition von Globin mit z.B. ^{14}C -markierten Substanzen [178] selbst herstellen. Die Herstellung solcher Standards ist jedoch sehr aufwendig, zudem würden die Messsysteme mit radioaktiven Isotopen kontaminiert. Eine mögliche Alternative stellt die Verwendung freier, modifizierter Aminosäuren dar. Die Derivatisierungsausbeuten der freien und proteinständigen Aminosäuren unterscheiden sich jedoch stark, da aufgrund der geringeren Reaktivität der freien Carboxylgruppe gegenüber der Peptidbindung die Ringschlussreaktion zum Pentafluoroanilinothiazolinon-Kation für proteinständige Valine mit höheren Ausbeuten erfolgt. Eine weitere, in dieser Methode angewandte Möglichkeit zur Kalibrierung sieht die Verwendung von Dipeptiden vor, die dem N-Terminus der alkylierten α -Globinkette entsprechen. Die Aminogruppe des Valins trägt das entsprechende Alkyladdukt, während die Carboxylgruppe des Leucins als Anilid geschützt wird. Die Standards weisen daher einen der proteinständigen Aminosäure der α -Globinkette vergleichbaren pKs-Wert auf und sollten demnach zu identischen Ergebnissen führen [196]. 2-Ethoxyethyl-Val-Ala-Anilid wird als interner Standard für HyEtVal verwendet, da es aufgrund seiner Struktur ein dem Analyten sehr ähnliches Verhalten zeigt und kein deuterierter Standard zur Verfügung stand.

Für die Erstellung der Kalibriergeraden wird ein Pool aus Nichtraucher/Passivraucher-Globin mit bestimmten Konzentrationen an Standard dotiert und dann nach Methode (3.4.5.4.1 bzw. 3.4.5.4.2) aufgearbeitet. Durch die Zugabe einer konstanten Konzentration an deuteriertem Standard, dessen Wiederfindungsrate sowohl für die Derivatisierung als auch für die Aufarbeitung als übereinstimmend mit der Wiederfindungsrate des undeuterten Standards angenommen werden darf, lässt sich über das Verhältnis der detektierten Mengen von undeutertem zu deuteriertem Standard für jede Substanz eine Kalibriergerade erstellen. Die Verwendung von deuteriertem Standard erweist sich als ausgesprochen vorteilhaft, da selbst bei stark abweichenden absoluten Messwerten für einen Analyten (beispielsweise aufgrund unvollständiger Extraktion) sehr gute Ergebnisse nach der Bildung des Quotienten mit den Messwerten der entsprechenden deuterierten Standards erhalten werden. Da bei der hier vorgestellten Methode zahlreiche Extraktions- und Reinigungsschritte durchgeführt werden, ist der Einsatz deuterierter Standards bei diesem Verfahren sogar nahezu unumgänglich, wenn aussagekräftige Ergebnisse erhalten werden sollen. Darüber hinaus stellt die Verwendung des

IDS ein wichtiges Hilfsmittel bei der Auswertung dar, da die Retentionszeit des deuterierten internen Standards nur wenige Sekunden kleiner ist als die des jeweiligen Analyten, wodurch eine Identifizierung wesentlich erleichtert wird. Außerdem wurde die Konzentration des IDS so gewählt, dass die Peakflächen von Standard und Analyt in der gleichen Größenordnung sind, sie also auch eine vergleichbare Basisbreite haben.

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion des derivatisierten Globins ist auf eine vollständige Durchmischung bei der Extraktion mit MTBE zu achten. Deshalb wird ein Multi-Tube-Vortexer zur Durchmischung genutzt, da Tischschüttelgeräte, Ultraschall oder Magnetrührer zu unvollständiger Extraktion führen. Dreimalige Extraktion hat sich als ausreichend erwiesen, weitere Extraktionsschritte steigern die Ausbeute nur unwesentlich und stehen einem großen zeitlichen Mehraufwand gegenüber. Bei den Waschschritten nach dem Eindampfen der Etherphase besteht die größte Gefahr für Verluste: geringe Mengen Toluol werden mit der Wasserphase immer abgesaugt. Beim Abnehmen der Toluolphase ist darauf zu achten, dass völlig wasserfrei gearbeitet wird, wenn nach Methode (3.4.5.4.2) verfahren wird, da sonst die Messung beeinträchtigt werden kann. Kleinere Wasserspuren mindern die Qualität der Retention der Analyten auf der Cyanopropyl-Kartusche bei der Festphasenextraktion (Methode 3.4.5.4.1) nicht. Das Waschen mit der Natriumcarbonatlösung scheint für die Entfernung eines Großteils vorhandener Verunreinigungen essentiell zu sein, da - im Gegensatz zum Waschen mit Wasser - der gelbliche Farbton der organischen Phase nach dem Schütteln vorwiegend in die wässrige Phase übergeht.

Alle Versuche, eine sichere Identifizierung des EtVal-Peaks nach Methode 3.4.5.4.2 beispielsweise durch Variation der chromatographischen Parameter zu erreichen (Injektions- und Transferlinientemperatur, Temperaturprogramm, Trägergasfluss oder Trägergasdruckprogramm, Polarität der Säule bis hin zur Verwendung einer Säule mit 50 % Phenyl-Siloxan-Anteil, Länge der Trennsäule bzw. deren Trennfilmstärke), führten nicht zum gewünschten Erfolg. Zwar lassen sich die Retentionszeiten der Analyten mit geänderten Temperatur – und/oder Druckprogrammen um mehrere Minuten verschieben, die Matrixeffekte, die für die Überlagerung des EtVal-Peaks verantwortlich sind, lassen sich auf diese Art und Weise jedoch nicht reduzieren. Bei Verwendung polarerer Säulen, z.B. einer HP 35 (60 m x 0,25 mm ID x 0,33 µm Film) oder ZB 50 (25 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm Film), kehren sich die Retentionszeiten von MeVal und EtVal um, d.h., EtVal eluiert vor MeVal. Doch selbst dadurch kann keine Reduktion der Matrix erzielt werden.

Gesicherte EtVal-Werte können nur durch eine Verringerung der Matrix vor der Messung gewonnen werden. Zu diesem Zweck wird die Methode um eine Festphasenextraktion an

einer Normalphase erweitert. Die Umkehrphasenchromatographie scheidet wegen der äußerst geringen Löslichkeit der Analyten in Wasser aus. Ein klassisches Material der Normalphasenchromatographie stellen Silika-Kartuschen dar. Auf Si-Kartuschen alleine lassen sich die Analyten jedoch nicht retenieren, selbst wenn die Sorbensmenge auf 1 g/Kartusche gesteigert wird. Dieser Effekt ist unabhängig vom eingesetzten Lösungsmittel und von der Konditionierung der Kartuschen. Getestet wurden (nach steigender Polarität geordnet) Hexan, Cyclohexan, Dichlormethan, Toluol, Methyl-tert.-butyl-ether, Ethylacetat. Erst die Kombination der Silika-Kartuschen mit Cyanopropyl-Kartuschen garantiert eine ausreichende Retention der Analyten. Die Retention der Analyten auf der Cyanopropyl-Kartusche kann über Wechselwirkungen der π -Systeme zwischen dem Pentafluorophenyl-Ring des Thiohydantoin und der C-N-Bindung erklärt werden. Auch die Heteroatome tragen mit ihren entsprechenden π -Systemen zur Retention bei. Wichtig ist, dass nicht-nachsilylierte Cyanopropylkartuschen verwendet werden. Dadurch wird eine Bindung von Matrixkomponenten über Wasserstoffbrückenbindungen erreicht. Die Elutionskraft des verwendeten Lösungsmittelgemisches reicht entweder nicht aus, diese Wechselwirkungen zu brechen oder die Matrixkomponenten, die von der Cyanopropylkartusche mit den Analyten auf die Silika-Kartusche eluiert werden, werden dort auf Grund der noch stärkeren Wechselwirkungen mit Silanol-Gruppen wieder reteniert, während die Analyten die Silika-Kartuschen unreteniert passieren.

Wichtig ist, dass die Analyten auf die Cyanopropyl-Kartuschen aufgetragen werden und erst danach die Silika-Kartuschen durchlaufen. Im umgekehrten Fall lassen sich nur Extrakte geringerer Reinheit gewinnen, die noch dazu schlechtere Wiederfindungen bieten und somit eine Auswertung des EtVal-Peaks sehr erschweren.

Die saubersten Extrakte lassen sich erzielen, wenn man die Proben bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit insgesamt 10 ml Hexan extrahiert und den Extrakt direkt auf die Cyanopropyl-Kartuschen aufträgt. Ein Durchlaufen der Analyten ist selbst bei dieser Lösungsmittelmenge nicht zu befürchten. Die Extraktion mit Hexan hat den Vorteil, dass nicht zur Trockene eingeeengt werden muss und die gesamte Waschprozedur mit Wasser und Natriumcarbonat-Lösung entfallen kann. Ferner kann nach dem Auftragen durch fraktionierte Elution mit 1 % Ethylacetat in Hexan ein großer Anteil der Matrix entfernt werden, bevor mit 10 % Ethylacetat in Hexan eluiert wird (Abb. 5.1).

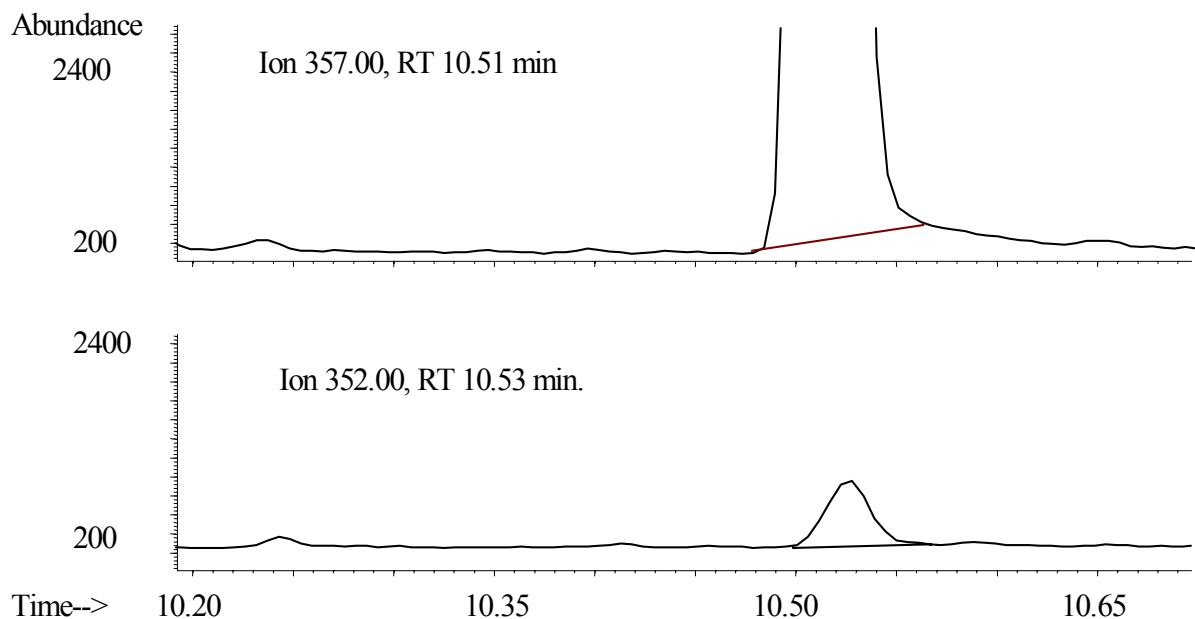


Abb. 5.1: Chromatogramm einer Realprobe nach SPE, eluiert mit 10 % EtOAc in Hexan. Gezeigt werden Ionenspuren von $[D_5]$ -EtVal und EtVal

Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die Festphasenextraktion das Grundrauschen der gemessenen Ionenspuren auf unter 200 reduziert wird. Ferner ist der EtVal-Peak nicht durch Störpeaks überlagert. Der gezeigte Peak entspricht einer absoluten Fläche von 5690 Flächeneinheiten. Nachteil dieser Methode ist, dass HyEtVal und CyEtVal nicht mit erfasst werden können. Selbst wenn der Ethylacetatanteil im Elutionsmittel auf 20 % erhöht wird, liegt die Wiederfindung des CyEtVal verglichen mit einer Probe ohne SPE nur bei ca. 30 %. Trägt man nach LLE den MTBE-Extrakt direkt auf die Kartuschen auf, lässt sich praktisch keine Retention der Analyten auf der Cyanopropyl-Kartusche erzielen. Selbst bei einem MTBE-Anteil von 20 % in Hexan kann ein Durchbruch der Analyten durch die Kartuschen nicht verhindert werden. Wird die Toluolphase nach LLE auf die mit Toluol vorkonditionierten Kartuschen aufgetragen, können die Analyten über die oben angesprochenen Wechselwirkungen festgehalten werden. Allerdings ist es nicht möglich, der Elution einen Waschschrift vorzuschalten. Bereits mit reinem Toluol lassen sich MeVal und EtVal wieder von den Kartuschen eluieren. Der Ethylacetatanteil von 1 % in Toluol dient der gleichzeitigen Elution von CyEtVal. In Abb. 5.2 ist das Messsignal für $[D_5]$ -EtVal- und EtVal nach einer Aufreinigung auf die eben besprochene Weise dargestellt. Wird der Ethylacetatanteil im Elutionsmittel auf 5 % oder mehr erhöht, lässt sich beobachten, dass

Matrixkomponenten in steigendem Maße miteluiert werden, die dann die folgende Chromatographie entsprechend stören und zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.

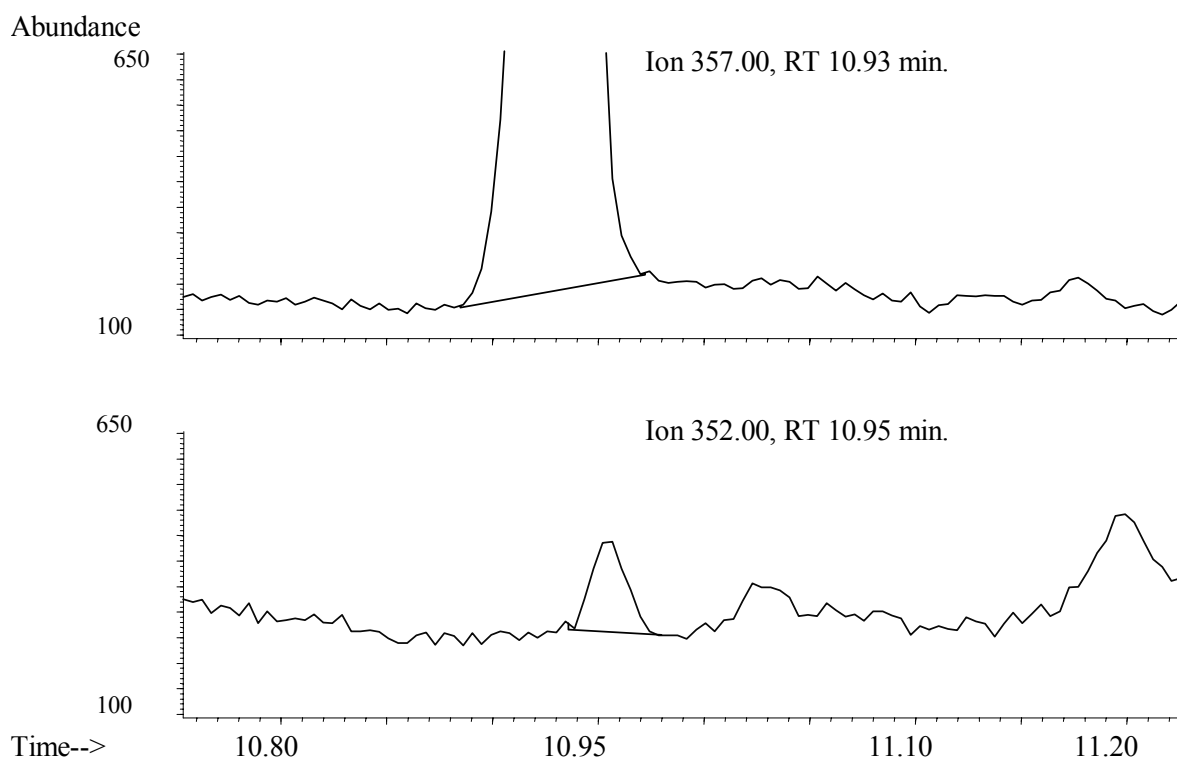


Abb. 5.2: Chromatogramm einer Realprobe nach SPE, eluiert mit 1 % EtOAc in Toluol. Gezeigt werden Ionenspuren von $[D_5]$ -EtVal und EtVal

Nachteil der vorliegenden Methode ist, dass auch in diesem Falle HyEtVal nicht erfasst wird. Eine mögliche Erklärung könnte eine Retention des HyEtVal auf der Silika-Kartusche sein, oder HyEtVal wird erst gar nicht von der Cyanopropyl-Kartusche auf die Silika-Kartusche eluiert. Ferner stellt Toluol nicht die erste Wahl eines Lösungsmittels für Normalphasenchromatographie dar. Vor allem das Einengen der 8 ml Toluol erfordert einen hohen Zeitaufwand und viel Stickstoff. Hier bietet sich ein möglicher Ansatz für weitere Verbesserungen der Methode. Durch geeignete Lösungsmittel (-gemische) lässt sich vielleicht auch HyEtVal mit erfassen, wenn es gelingt, die Wasserstoffbrückenbindungen zu brechen. Nachdem die Probe in einem Eindampfröhrchen bis zur Trockene eingengt worden ist, muss vorsichtig in 50 μ l Toluol aufgenommen werden. Es ist darauf zu achten, dass sich der Rückstand vollständig auflöst. Nachextraktionen haben ergeben, dass bis zu 5 % der Analyten an der Wand des Eindampfröhrchens hängen bleiben und verloren gehen.

Soweit möglich, werden die Kenndaten der Methoden bestimmt [263-266]. Präzision und Reproduzierbarkeit der Messungen sind für beide Methoden als sehr gut zu beurteilen, legt man bei EtVal und CyEtVal zugrunde, dass die Nichtraucherproben fast ausschließlich an der Bestimmungsgrenze liegen. Die Variationskoeffizienten in der Serie der verschiedenen Aufarbeitungen bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie die der Variationskoeffizienten von Tag zu Tag.

Es ist wichtig, bei der Beurteilung eines analytischen Verfahrens zwischen Präzision und Richtigkeit zu unterscheiden [267,268]. Ein präzises Verfahren bedeutet, dass die Streuung klein ist. Richtigkeit bedeutet, dass das Analysenresultat nur wenig vom wahren Wert abweicht. Voraussetzung für die Bestimmung der Richtigkeit wäre jedoch ein Globin mit definiertem Gehalt an N-Alkyl-substituierten Valinen und zusätzlich die entsprechenden Thiohydantoinderivate der Verbindungen, möglichst als zertifiziertes Referenzmaterial.

Die Wiederfindungsraten für die Hb-Addukte sind sehr unterschiedlich und fallen bei CyEtVal am niedrigsten aus. Die Daten decken sich allerdings mit Literaturangaben [203], die von 35 - 40 % Wiederfindungsrate für CyEtVal ausgehen. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methoden werden nach zwei Verfahren berechnet [242]. Sie liegen in der gleichen Größenordnung, wobei für die LLE-Methode (3.4.5.4.2) die Nachweisgrenzen zwischen 40 und 80 % unter denen der Methode 3.4.5.4.1 liegen. Das lässt sich mit Verlusten durch die SPE erklären, durch die die absolute Signalintensität im Chromatogramm abnimmt. Die Bestimmungsgrenzen nach der Leerwertmethode sind als objektiv zu hoch einzuschätzen, fallen doch bei Anwendung dieser Methode nahezu alle Nichtraucherproben als nicht mehr bestimmbar aus. In allen Fällen kann jedoch ein Peak sicher identifiziert werden, der mindestens 10:1 über dem Rauschen liegt, so dass die Quantifizierung der Studienproben nach Methode Signal/Rauschen erlaubt ist. Berücksichtigt man zusätzlich noch, dass ein Leerwert im Sinne von Kromidas [242] nicht vorliegt, da kein adduktfreies Globin zur Verfügung steht, ist das Zustandekommen der hohen Werte für NWG und BSG verständlich. Vergleicht man die hier erzielten NWG's bzw. BSG's mit Literaturangaben [81,188,197,202], wird deutlich, dass in allen genannten Publikationen nach der Signal/Rauschen-Methode vorgegangen wird. Die ermittelten Werte liegen in dem Bereich, der auch in diesen Literaturstellen angegeben wird.

Die Bestimmung der Selektivität der Methoden stützt sich vor allem auf die Charakterisierung der synthetisierten oder kommerziell erworbenen Standards durch GC-MS mit Elektronenstoßionisation (EI) und Negativionen-chemischer Ionisation. Die Bestätigung der Strukturen kann damit als gesichert gelten, da die beiden genannten Detektionsarten eine unter-

schiedliche Selektivität aufweisen. Teilweise können auch Literaturdaten zur Identifizierung herangezogen werden [182,189,190,197,201]. Aus den EI-Spektren der Substanzen lässt sich ein allgemeines Fragmentierungsschema (Abb. 5.3) ableiten. Die Fragmentierung der Substanzen mit NICI/EC verläuft sehr unterschiedlich, es wird daher kein allgemeines Fragmentierungsschema abgeleitet.

In Tab. 5.1 sind für die EI-Massenspektren die Molekülfragmente und –massen wiedergegeben, die sich nach dem gleichen Fragmentierungsmuster ergeben. In Tab. 5.2 sind die Fragmente und Molekülmassen, die bei der NICI/EC-MS erhalten wurden, dargestellt.

Tab. 5.1: m/z der Substanzen für EI-MS

<i>Fragment</i>	<i>EtOEt-Val-PFPTH</i>	<i>HyEtVal-d0-PFPTH</i>	<i>CyEtVal-d0-PFPTH</i>	<i>CyEtVal-d3-PFPTH</i>	<i>MeVal-d0-PFPTH</i>	<i>MeVal-d3-PFPTH</i>	<i>EtVal-d0-PFPTH</i>	<i>EtVal-d5-PFPTH</i>
M-[CO]	-	-	349	352	310	313	324	329
M-[C ₃ H ₆]	-	-	335	338	296	299	310	315
M-[C ₃ H ₆]-R	282	-	282	283	-	-	282	283
M-[CH ₃]	381	-	362	365	323	326	337	342
M-[CH ₃]-R	-	-	309	310	-	-	309	310
C ₆ F ₅ -NCS	225	225	225	225	225	225	225	225
C ₆ F ₅	167	-	167	167	167	167	167	167

Tab. 5.2: m/z der Substanzen für NICI/EC-MS

<i>Fragment</i>	<i>EtOEtVal-PFPTH</i>	<i>HyEtVal-d0-PFPTH</i>	<i>CyEtVal-d0-PFPTH</i>	<i>CyEtVal-d3-PFPTH</i>	<i>MeVal-d0-PFPTH</i>	<i>MeVal-d3-PFPTH</i>	<i>EtVal-d0-PFPTH</i>	<i>EtVal-d5-PFPTH</i>
M	-	368	377	380	338	341	-	-
M-[H]	395	-	-	-	-	-	351	356
M-[C ₂ H ₄]	-	-	349	349	-	-	-	-
M-[CO]	-	-	349	352	-	313	-	-
M-[CO-HF]	-	-	-	-	-	293	-	-
M-[C ₂ H ₄ -HF]	-	-	329	329	-	-	-	-
M-[CH ₂ CH ₂ CN]	-	-	323	323	-	-	-	-
M-[CH ₂ CH ₂ CN-F]	-	-	304	304	-	-	-	-

Fortsetzung Tab. 5.2:

Fragment	<i>EtOEtVal</i> - <i>PFPTH</i>	<i>HyEtVal</i> - <i>PFPTH</i>	<i>CyEtVal</i> - <i>d0</i> - <i>PFPTH</i>	<i>CyEtVal</i> - <i>d3</i> - <i>PFPTH</i>	<i>MeVal</i> - <i>d0</i> - <i>PFPTH</i>	<i>MeVal</i> - <i>d3</i> - <i>PFPTH</i>	<i>EtVal</i> - <i>d0</i> - <i>PFPTH</i>	<i>EtVal</i> - <i>d5</i> - <i>PFPTH</i>
M-[CO-F-C ₂ H ₂ (CH ₃) ₂]	-	-	274	277	-	-	-	-
M-[F]	377	-	-	-	-	-	-	-
M-[HF]	-	348	357	360	318	-	-	-
M-[H-HF]	-	-	-	-	-	-	331	336
M-[2 HF]	-	-	-	-	298	-	-	-
M-[H-HF-HCHO]	-	317	-	-	-	-	-	-
M-[F-CS-NR]	246	-	-	-	-	-	-	-
[C ₆ F ₄ -NC-CH ₃]	-	-	-	-	189	-	189	189

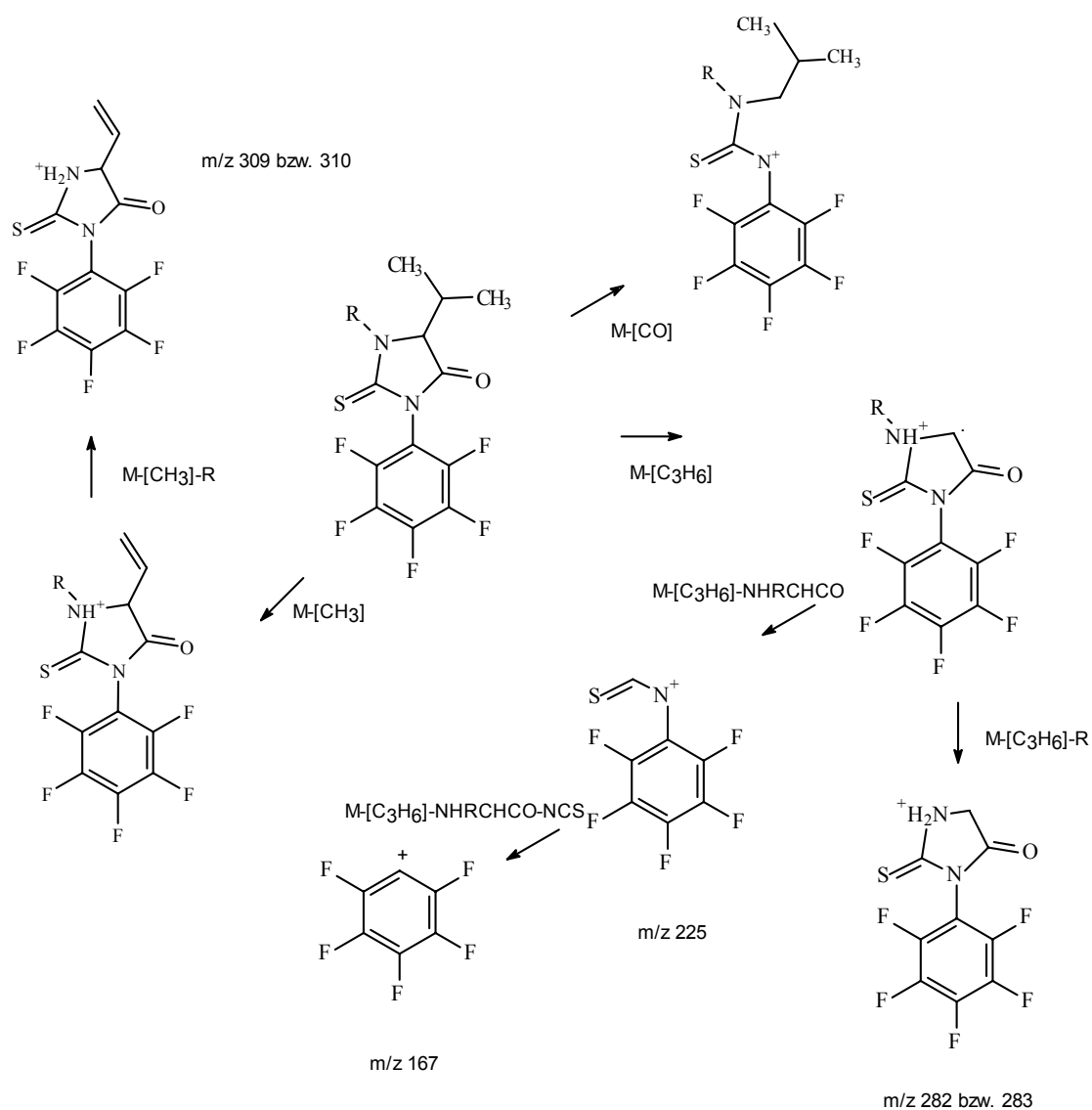


Abb. 5.3: Vorschlag eines allgemeinen Fragmentierungsschemas (GC-MS-EI)

Nach der Stickstoffregel von Silverstein et al. [269] besitzt ein Molekül mit einer geradzahlig Molmasse kein oder eine gerade Anzahl von Stickstoffatomen. Signale mit $[(M+2)]^+$ deuten auf die Anwesenheit von Schwefel im Molekül hin, da Schwefel das einzige Element in den jeweiligen Addukten ist, das bedeutend zur Intensität dieses Isotopensignals beiträgt, da sein schweres Isotop mit einer Häufigkeit von 4,4 % auftritt.

Am Beispiel des EI-MS-Spektrums von CyEtVal-PFPTH soll gezeigt werden, dass die postulierten Fragmente mit den Isotopensignalen gut übereinstimmen. Neben dem Molekölion mit m/z 377 treten für $[(M+1)]^+$ ein Signal mit 16,9 % (berechnet 18,54 %) und eines für $[(M+2)]^+$ mit 5,6 % (4,41 %) Häufigkeit auf. Beim Fragment m/z 335 treten $[(M+1)]^+$ mit 14,7 % (15,15 %) und $[(M+2)]^+$ mit 6,3 % (4,41 %) auf. Ähnliche Beobachtungen lassen sich auch bei m/z 282 machen: $[(M+1)]^+$ mit 11,4 % (11,47 %) und $[(M+2)]^+$ mit 5,2 % (4,41 %); bei m/z 362: $[(M+1)]^+$ mit 6,3 % (17,4 %) und $[(M+2)]^+$ mit 3,4 % (4,41 %). Bei einigen Fragmenten ist die Übereinstimmung allerdings nicht mehr so gut: m/z 225 mit $[(M+1)]^+$ 44,9 % (9,2 %) und $[(M+2)]^+$ 12,6 % (4,21 %); m/z 309 mit $[(M+1)]^+$ 20,23 % (13,67 %) und $[(M+2)]^+$ 10,6 % (4,41 %) sowie bei m/z 349 mit $[(M+1)]^+$ 46,2 % (17,4 %) und $[(M+2)]^+$ 34,9 % (4,21 %). Wahrscheinlich treten diese Signale auch bei diversen Verunreinigungen in der Probe auf und verfälschen so die Isotopenhäufigkeit. Für die anderen gemessenen Addukt-Derivate sind die Isotopenhäufigkeiten im Anhang 8.3 (Tab. 8.3 – 8.18) aufgelistet. Das Fragment m/z 316, dessen Struktur nicht aufgeklärt werden konnte, muss aufgrund der Isotopensignale $[(M+1)]^+$ 19,62 % und $[(M+2)]^+$ 8,9 % noch Schwefel enthalten. Ohne Schwefel wäre die Häufigkeit für $[(M+2)]^+$ wesentlich geringer. Des weiteren lässt sich aus der Stickstoffregel folgern, dass nur noch zwei Stickstoffatome im Fragment sind.

Aus dem Molekölion entsteht durch α -Spaltung mit anschließender Decarbonylierung das Fragment m/z 349. Durch Abspaltung eines Methylradikals gelangt man zu m/z 362, aus dem sich durch Oniumreaktion m/z 309 bildet. Durch McLafferty-Umlagerung entsteht m/z 335, das über eine Oniumreaktion zu m/z 282 weiter abgebaut wird. Außerdem entsteht daraus durch Ringöffnung und Abspaltung des $[\text{COCHNHR}]$ -Radikals m/z 225. Durch ladungsinduzierte Abspaltung von $[\text{NCS}]$ entsteht das Fragment m/z 167.

Die Robustheit der Methode ist durch einen Laborvergleich bestätigt worden. Auch bei Konzentrationen, die im Bereich des Hintergrundrauschens liegen, kann mit unterschiedlichen Mitarbeitern an verschiedenen Tagen eine hohe Präzision erzielt werden. Aus diesem Grunde kann die Methode im Routinebetrieb auch für die Ultra-Spurenanalytik eingesetzt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit der weiterentwickelten Methode erstmals das N-terminale Valinaddukt ethylierender Substanzen im Ultra-Spurenbereich bestimmt werden kann, wobei sich die Quantifizierung auf einen strukturanalogen deuterierten Standard stützt. Dieses Verfahren ist als wesentlich genauer und selektiver einzuschätzen als kürzlich publizierte Daten von Chen et al. [270], die ihre Messungen mit einem zwar ebenfalls deuterierten, jedoch methylierten Peptidstandard quantifizieren. Auf Grund der genannten chromatographisch schwierigen Auswertung ohne strukturanaloge interne Standards darf die sichere Identifizierung des Analyten in dieser Publikation angezweifelt werden. Um absolute Wiederfindungen angeben zu können, sollten deuterierte Tripeptide und die korrespondierenden Thiohydantoinderivate synthetisiert werden, um quantitative Aussagen über die Ausbeute der Derivatisierung und Aufreinigung treffen zu können und so die Methodenkenndaten noch valider zu gestalten.

5.1.2 Vergleich mit Literaturdaten

Die Adduktlevel, die mit den beiden Methoden gemessen werden, unterscheiden sich erheblich voneinander. Allerdings sind die Daten nach Methode 3.4.5.4.1 wegen der verwendeten deuterierten Standards als genauer einzuschätzen als die Werte, die nach Methode 3.4.5.4.2 erzielt werden. Im Falle des Ethylvalins müssen die Werte der LLE-Methode stark angezweifelt werden. Die unabhängigen Aufarbeitungen korrelieren nicht miteinander, außerdem liegen die Werte relativ hoch. Für HyEtVal können mit der SPE-Methode keine Werte gemessen werden. Die Daten sind in sich jedoch insoweit konsistent, als die jeweiligen Analyten untereinander korrelieren und der Zusammenhang zu anderen Biomarkern zwischen den beiden Methoden nahezu identisch ausfällt. Die unterschiedlichen Messergebnisse beim Vergleich der beiden Methoden könnten auch auf einen Alterungseffekt entstanden durch die lange Lagerung der Proben zurückzuführen sein. Törnqvist [262] berichtet zumindest in Einzelfällen für HyEtVal von einer bis zu 8-fachen Zunahme der Adduktrate innerhalb von 6 Monaten. Ebenfalls dort finden sich Angaben, dass die gewonnenen Blutproben möglichst sofort bis zum Globin weiter aufgearbeitet werden sollen. Im Falle der PAH-Studie war das mit den Proben aus organisatorischen Gründen nicht möglich, so dass das Erythrozytenhämolysat eingefroren aufbewahrt werden musste. Zwischen den Messungen gemäß den Methoden ohne und mit SPE liegt ein Zeitraum von 18 Monaten. Für jede der Messungen wurde das Globin neu isoliert, so dass die Werte schon auf

Grund der unterschiedlich langen Lagerungsdauer der Erythrozytenhämolysate differieren können. Des weiteren sollte die insgesamt lange Lagerzeit der Proben von über 5 Jahren nicht außer Acht gelassen werden, wenn es um die Bewertung der unterschiedlichen Methoden geht. Für den Vergleich mit Literaturdaten werden daher die ermittelten Adduktraten nach SPE-Methodenaufarbeitung verwendet, für die Hydroxyethylwerte werden die Daten nach Aufarbeitung mit LLE-Methode angewandt (Tab. 5.3). Bei der Auswertung ergibt sich für keines der Addukte ein geschlechtsspezifischer Unterschied. Auf die Auswertung eines möglichen Alterseinflusses wird verzichtet, da die Gruppen sonst zu klein werden und die statistische Verifizierbarkeit nicht mehr gegeben ist.

Tab. 5.3: PAH-Studie im Vergleich mit Literaturdaten

<i>Quelle</i>	<i>MeVal</i>		<i>EtVal</i>		<i>HyEtVal</i>		<i>CyEtVal</i>	
	<i>[pmol/g Globin]</i>		<i>[pmol/g Globin]</i>		<i>[pmol/g Globin]</i>		<i>[pmol/g Globin]</i>	
	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R
ABF	351,5	490,2	42,8	45,2	61,3	185,4	43,7	197,3
Chen et al. [270]	871	881	0,75	3,82	-	-	-	-
Müller et al. [181]	-	-	-	-	50 ^a	280	-	-
Bergmark et al. [182]	-	-	-	-	18	126	< 2 ^b	106
Bono et al. [271]	-	-	-	-	16,8 ^c	59,5	-	-
Lewalter [82]	340 ^d	413	-	-	< 79	158	< 19	150
Fennell et al. [185]	-	-	-	-	12,9 ^e	242	4,9	252
Farmer et al. [195]	-	-	-	-	30,3 ^f	150,9	-	-
Tavares et al. [81,198]	-	-	-	-	7,3	55,2	-	-
Bader et al. [196]	-	-	-	-	63 ^f	361	n.n.	217
Törnqvist et al. [199,272]	-	-	-	-	42	147	n.n.	99,5
Osterman-Golkar et al. [197]	1175 ^g	1546	-	-	46	171	-	-
	219 ^h	271	-	-	16	146	-	-
	-	-	-	-	58	389	-	-
	-	-	-	-	-	-	n.n. ^h	90

Fortsetzung Tab. 5.3:

<i>Quelle</i>	<i>MeVal</i>		<i>EtVal</i>		<i>HyEtVal</i>		<i>CyEtVal</i>	
	<i>[pmol/g Globin]</i>		<i>[pmol/g Globin]</i>		<i>[pmol/g Globin]</i>		<i>[pmol/g Globin]</i>	
Arbeitsplatzexpositionen								
	Kontrolle	Exponiert	Kontrolle	Exponiert	Kontrolle	Exponiert	Kontrolle	Exponiert
Tates et al. [273]	-	-	-	-	-	≤ 13 000 ⁱ	-	-
Tavares et al. [81]	-	-	-	-	-	-	31,1 ⁱ	1984 2276
Thier et al. [274]	-	6,7 ^k	-	-	-	-	-	59,8 – 70,3
Boogaard et al. [190]	-	-	-	-	19 ⁱ	46	-	-
van Sittert et al. [188]	-	-	-	-	43 ⁱ	238	-	-
	-	-	-	-	76	145	-	-
	-	-	-	-	188	53	-	-

- a: Median. Raucher (N = 6, 5 Männer, 1 Frau; 10 – 25 Zigaretten pro Tag), Nichtraucher (N = 21, 12 Männer, 9 Frauen)
- b: Raucher (N = 10), Nichtraucher (N = 15); insgesamt 53 % Frauen; Messung erfolgt mit GC-MS/MS mit chemischer Ionisation
- c: Raucher (N = 44), Nichtraucher (N = 74) und Passivraucher zu einer Gruppe zusammengefasst
- d: Gruppen sind unterschiedlich stark besetzt, jedoch immer >90; signifikante Unterschiede bei allen Addukten
- e: Nichtraucher (N = 16) haben signifikant niedrigere Werte als Raucher (N = 32, 20 oder 40 Zigaretten pro Tag)
- f: Mütter und Neugeborene untersucht
- g: Nichtraucher (N = 32); Raucher (N = 37) haben für beide Addukte signifikant erhöhte Werte
- h: Unterschiedlich große Kollektive untersucht. Weitere Details im Text
- i: Unterschiedlich große Kollektive mit verschiedener Expositionsquelle und –dauer
- k: Werte in µg/l Blut bei 59 Arbeitern

Im direkten Vergleich mit Literaturdaten wird deutlich, dass die weiterentwickelte Methode in der Lage ist, reproduzierbare Daten zu liefern, die gut mit bereits publizierten Werten übereinstimmen. Nur in einer der genannten Publikationen wird EtVal überhaupt gemessen, die dort ermittelten Werte fallen sehr niedrig aus und sind mit den unter 5.1.1 genannten Ungenauigkeiten behaftet. Die Adduktlevel bei Lewalter [82] und Törnqvist [199,272] sind methodisch sehr ähnlich erzielt worden und damit gut vergleichbar. Farmer et al. [195] und Tavares et al. [81,198] berichten für HyEtVal und CyEtVal von einer Übertragung der entsprechenden Vorläufer (Ethylenoxid bzw. Acrylnitril) von schwangeren Frauen auf ihre noch ungeborenen Babys. Für beide Addukte lassen sich signifikante lineare Abhängigkeiten zwischen den Adduktraten der Mutter und ihres Kindes erkennen ($r = 0,933$ nach Mann-Whitney-Test). Für die Werte von Bader et al. [196] bestätigen sich die Aussagen, dass die freien Aminosäuren, die in dem Falle als interne Standards eingesetzt wurden, auf Grund

unterschiedlicher pKs-Werte völlig andere Derivatisierungsausbeuten aufweisen als die Dipeptide. Nur so lassen sich die sehr hohen Werte erklären. Dennoch lässt sich auch in diesem Fall die Annahme bestätigen, dass Raucher gegenüber Nichtrauchern höhere Methylvalin-Addukte aufweisen. Vergleicht man die Arbeitsplatzexpositionen mit den gemessenen Hintergrundbelastungen, stellt man fest, dass die Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern in dem massiven Expositionslevel untergehen. Die Werte der Kontrollen liegen jedoch in den Bereichen wie sie bei beruflich nicht-exponierten Personen zu erwarten sind. Lediglich in der Arbeit von van Sittert et al. [188] ist ein hoher Anstieg der Hintergrundbelastung im Verlauf dreier Studien zu erkennen, der jedoch auf systemische Ursachen zurückgeführt wird. In dem Falle wurden 39, 41 und 48 Arbeiter untersucht, die in eine exponierte und eine nicht-exponierte Gruppe eingeteilt wurden. Die Proben wurden sowohl mit einer RIA-Methode als auch teilweise mit GC-MS nach Edman-Abbau gemessen. Der Anstieg der Adduktlevel innerhalb der Kontrollgruppen wird auf einen gerätespezifischen Faktor bei den RIA-Messungen zurückgeführt. Dass diese systemisch bedingte Zunahme der Adduktlevel nicht auch bei der exponierten Gruppe gefunden wird, ist auf unterschiedliche Messzeiten zurückzuführen.

5.2 Mercaptursäuren

5.2.1 Analytische Methode

Die neuentwickelte Methode zur Bestimmung von Mercaptursäuren alkylierender Verbindungen gestattet die schnelle, hoch selektive und sensitive Quantifizierung von gleichzeitig 5 Mercaptursäuren mittels HPLC-APCI-MS/MS mit einer Messdauer von weniger als 4 Minuten. Diese klassischen Entgiftungsprodukte stehen somit einem Monitoring zur Verfügung, mit dem in kurzer Zeit eine hohe Probenzahl bewältigt werden kann. Aufgrund der einfachen Probenvorbereitung können bis zu 60 Proben pro Woche als Doppelansätze bestimmt werden. Wenn das Verfahren automatisiert werden kann, lässt sich diese Zahl sicherlich noch weiter steigern. Grundlage des Verfahrens ist eine einfache Festphasenextraktion an einem Polymermaterial. Im Vergleich zu herkömmlichen Materialien erfolgt bei den ENV+-Kartuschen eine Nachhydroxylierung, so dass echte phenolische Gruppen auf der Oberfläche für Wechselwirkungen mit den Analyten zur Verfügung stehen (Abb. 5.4).

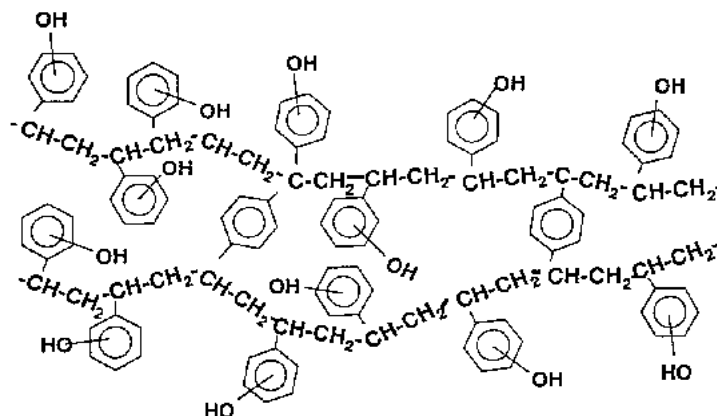


Abb. 5.4: ENV+-Polymermaterial mit phenolischen Gruppen

Die Adsorption der Analyten auf dem Polymermaterial können nur aus p_π oder p_π^* -Wechselwirkungen bestehen („normale“ Reversed Phase-Chromatographie). Die Analyten sollten daher auf Grund ihrer hohen Polarität relativ leicht und vor allem unspezifisch gebunden sein. Die für eine konstante Wiederfindung geforderten gleichbleibenden Flussraten lassen sich bei der Festphasenextraktion von Hand nur durch Vakuumkontrolle mittels eines Büchi-Vakuum-Controllers erzielen. Der Versuch, die Proben direkt im Eluens (also Methanol mit 2 % Eisessig) auf der LC-MS/MS zu messen scheitert daran, dass das Methanol die Chromatographie zu stark stört (10 μ l Injektionsvolumen bei 300 μ l Flussrate bei Messung mit ESI). Deshalb werden die Proben zur Trockene eingengt und in HPLC-Laufmittel aufgenommen.

Ein Vergleich der ENV+-Kartuschen mit Anionentauscherkartuschen auf Polymerbasis (PE-AX) ergibt bessere Wiederfindungsraten bei den ENV+-Kartuschen auf Grund der unspezifischeren Wechselwirkungen mit den in ihrer Polarität stark unterschiedlichen Analyten. Die Werte zeigen eine höhere Reproduzierbarkeit, außerdem ist die Methode schneller, weil mit fast reinem Methanol eluiert werden kann, das sich an der Speedvac schneller abziehen lässt. Die chromatographische Trennung erfolgt auf einer 75 mm kurzen Luna C18-Säule, die auf Grund ihrer kleinen Partikelgröße von 3 μ m eine hohe Bodenzahl und damit eine hohe Trennleistung garantiert. Dadurch gelingt zumindest eine Antrennung der polarerer Analyten. Die Säule erweist sich ferner trotz des niedrigen pH-Wertes als stabil über größere Probenserien. So können bis zu 600 Messungen von Realproben mit einer Säule erfolgen, ohne dass die Peaksymmetrie verglichen mit den ersten Proben nachlässt.

Für die Messung der Mercaptursäuren kommen prinzipiell beide möglichen Verfahren der Ionisierung in Frage: Elektrospray (ESI) oder Atmosphärendruck-chemische Ionisation (APCI) [275,276]. Bei Ionisierung mittels Elektrospray wird eine in Lösung vorhandene Probe in einem starken elektrischen Feld versprüht, das zwischen der Kapillarspitze, aus der die Lösung austritt, und einer wenige Millimeter davon entfernt lokalisierten Gegenelektrode angelegt wird. Durch eine Öffnung im Zentrum dieser Gegenelektrode gelangen die gebildeten Ionen in den Analysatorteil des Massenspektrometers. Die ersten Arbeiten zum Elektrospray-Verfahren gehen auf Dole et al. zurück [277,278]. Die Weiterentwicklung der Verfahren mit kleinen Molekülen durch die Arbeitsgruppen von Fenn et al. [279] und Aleksandrov et al. [280,281] half die Prinzipien des Elektrosprayverfahrens so zu verstehen und zu optimieren, dass der Prozess eine definierte Ionisierung und komplette Desolvation von in Lösung versprühten Analytmolekülen bewirkte. Für diesen Vorgang gibt es verschiedene Modellvorstellungen [282-286]. Der tatsächliche Mechanismus dürfte abhängig von der Größe des untersuchten Moleküls und von gerätespezifischen Parametern einen Kompromiss der unterschiedlichen Modellsysteme darstellen und in etwa folgendermaßen ablaufen [282,287,288]: Es werden Tröpfchen mit etwa 1 bis 3 μm Durchmesser gebildet, die durch Verdampfung des Lösungsmittels (unterstützt durch ein Heizgas) zunehmend an Oberflächenladung gewinnen. Als Folge davon werden, wenn das Rayleigh-Limit von 10^8 V/cm^2 erreicht ist, kleine hochgeladene Mikrotröpfchen durch Coulomb-Explosionen (sogenannte „micro-fissions“) abgespalten, wobei diese Mikrotröpfchen so klein sein können, dass sie nur noch ein Analytmolekül in einem Lösungsmittelcluster enthalten. Schließlich werden diese Mikrotröpfchen durch den Trockengas-Vorhang bzw. eine Transferkapillare beim Transport in das Massenspektrometer vollständig desolvatisiert. Bei ESI erfolgt eine sehr effiziente Ionenbildung aus den gelösten Analytmolekülen (Ionisierungswahrscheinlichkeit 0,01 bis 0,1) verglichen mit EI (ca. 1×10^{-4}). Allerdings ist der Massenstrom konzentrationsabhängig, d.h., eine hohe Flussrate führt zu einem Verlust an Intensität. Die Ionisierung mittels der Atmosphärendruck-chemischen Ionisation erfolgt nach einem leicht abgeänderten Prinzip. Die Lösung der Analyten und Matrixkomponenten wird bei Temperaturen bis zu 300 °C erst verdampft und dann ionisiert, wobei die Ionisierung auf die Protonenübertragung von in Überschuss vorhandenen, geladenen Solvensmolekülen auf die Analytmoleküle zurückzuführen ist. Nachteil der Methode ist, dass die interessierenden Analyten thermostabil sein müssen, da ansonsten bereits in der Ionenquelle eine Kollisions-induzierte Fragmentierung (collision induced dissoziation, CID) auftreten kann. Vorteil der APCI-Ionisierung stellen die höheren Flussraten von bis zu 2 ml/min dar, die mit dieser

Ionenquelle noch ionisiert werden können. Neben höheren Injektionsvolumina ist ein entscheidendes Kriterium der APCI-Ionisierung das Fehlen von Konkurrenzreaktionen bei der eigentlichen Ionenbildung zwischen Analyt- und Matrixkomponenten. Gerade bei Urinproben lässt sich ein negativer Einfluss anorganischer Salze auf die Ionisierungseffizienz bei Elektrospray-Ionisierung beobachten. Zum einen können die anorganischen Ionen eine starke Ionenemission aus den Mikrotröpfchen hervorrufen und dadurch in Konkurrenz zu einer Ionenemission der Analytmoleküle treten, zum anderen können Salze bei der Verdampfung des Lösungsmittels in den Mikrotröpfchen auskristallisieren und so die Analytmoleküle irreversibel einschließen (Quenching oder Ion suppression) [289]. Bei der Ionisierung mittels APCI gehen viele Matrixkomponenten erst gar nicht in die Gasphase über.

Bei der Messung der Mercaptursäuren hat sich die Verwendung der APCI-Quelle als eindeutig bessere Variante herausgestellt, denn bei Einsatz der Elektrospray- bzw. Turbo-Ion-Spray-Quelle zeigt sich, dass nur mit dem HPLC-Laufmittel 20 mM Ameisensäure/Acetonitril 80:20 (V/V) reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Dieses Laufmittelsystem hat aber einige entscheidende Nachteile. Es ist sehr anfällig für pH-Schwankungen. Je nach pH-Wert des Wassers aus der Seradest-Reinstwasser-Anlage hat die 20 mM Ameisensäure einen pH-Wert zwischen 2,9 und 3,5. Der optimale pH-Wert für die Messungen liegt bei pH 2,3. Die Ameisensäure muss deshalb nachgestellt werden (mit Salzsäure), bei den unterschiedlichen Ausgangswerten ergeben sich jedoch unterschiedliche Konzentrationen an Cl⁻-Ionen, die sich durch Quenching nachteilig auf die Messungen auswirken. Das Säulenmaterial wird bereits nach ca. 50 Injektionen angegriffen. Obwohl die verwendeten Säulen der Fa. Phenomenex im pH-Bereich von 2 – 14 stabil sein sollten, lassen sich deutliche Sensitivitätsverluste erkennen, die mit stark verbreiterten Peaks einhergehen. Es können nur Proben gemessen werden, die in HPLC-Laufmittel aufgenommen sind. Bei einer Flussrate von 300 µl/min stören bereits 10 µl Methanol (Injektionsvolumen) die Chromatographie so stark, dass keine Reproduzierbarkeit mehr gegeben ist.

Um die oben genannten Effekte auszuschließen, ist die Chromatographie der MA auf APCI-MS/MS umgestellt worden. Es zeigt sich, dass die Mercaptursäuren thermisch stabil genug für Messungen mit APCI sind. Wegen des hohen Wasseranteils im Laufmittel sind in der Quelle Temperaturen von 500 °C notwendig. Dadurch erreichen die Analyten kurzzeitig Temperaturen von ca. 200 °C. Dennoch tritt keine messbare Fragmentierung bereits in der Quelle auf. Die Messung mit APCI hat gegenüber der TIS-Quelle einige Vorteile: Mit höheren Flussraten von 700 µl und Säulendurchmessern von 3 mm lassen sich genauso kurze

Laufzeiten von 4 min erreichen, das Signal/Rausch-Verhältnis ist bei APCI jedoch deutlich gesteigert. Allerdings ist die abs. Intensität der Signale leicht reduziert.

Als Laufmittel der Wahl hat sich für APCI ein 10 mM Ammoniumacetatpuffer pH 6,5 gegen Methanol 80:20 (V/V) erwiesen. Daraus ergibt sich eine Ionenstärke von 8 mM. Mit dieser Ionenstärke lassen sich auf unterschiedlichen Säulenmaterialien- und -längen hervorragende chromatographische Ergebnisse erzielen, die symmetrische, scharfe Peaks bei kurzen Laufzeiten liefern, die Signalintensität erhöhen und gleichzeitig die Säulenmaterialien schonen.

Die selektive Bestimmung gelingt durch das sogenannte Multiple Reaction Monitoring (MRM). Abb. 5.5 zeigt schematisch das Prinzip.

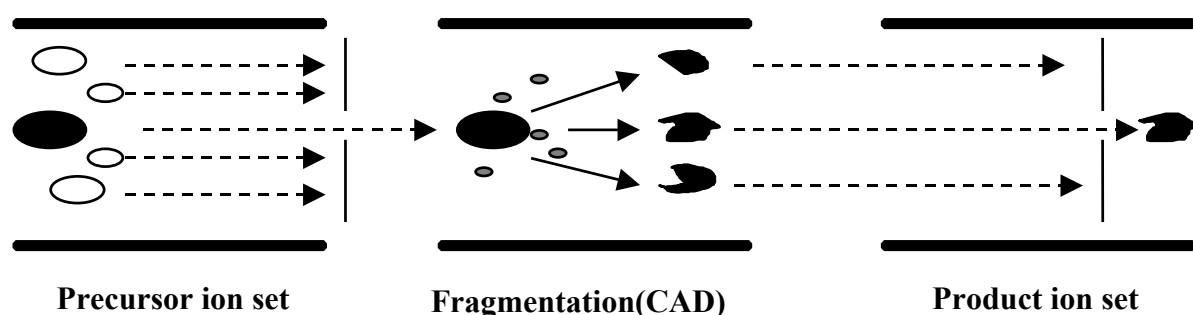


Abb. 5.5: Prinzip des Multiple Reaction Monitoring (MRM, Erklärung siehe Text)

Der erste Quadrupol ist so eingestellt, dass nur Analytmoleküle (hier als schwarzes Oval dargestellt) passieren können, die in der Kollisionszelle (2. Quadrupol) fragmentiert werden und schließlich im 3. Quadrupol die Detektion eines spezifischen Fragmentes erlauben. Diese für jeden Analyten spezifische Fragmentierung wird in Form einer „Quantitative optimization“ softwaregesteuert optimiert, um möglichst hohe Ausbeuten der spezifischen Ionenübergänge zu erzielen. Das Chromatogramm setzt sich dann aus Signalmeldungen zusammen, die eine Registrierung der beiden Masse-zu-Ladung-Verhältnisse im ersten und dritten Quadrupol voraussetzen.

Die Validierungsparameter der Methode sind wie im Falle der Hb-Addukte, soweit möglich, bestimmt worden. Die Präzision der analytischen Bestimmung ist gut, nur im Falle der Ethylmercaptursäure sind wegen der geringen absoluten Konzentrationen relativ hohe Variationskoeffizienten zu verzeichnen. Bis zu 31 % VK (bei 10 ppb), wie für EMA gefunden, können jedoch in spurenanalytischen Verfahren im Bereich der Nachweisgrenze toleriert werden [242]. Die relativen Wiederfindungsraten lassen auf eine nahezu quantitative

Erfassung der Analyten über den gesamten erwarteten Konzentrationsbereich schließen. Für die Quantifizierung werden auch in dieser Methode die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach der Methode Signal/Rauschen angewandt. Die Gründe dafür sind ähnlich denen der Hb-Addukt-Methode (5.1.1). Ein Leerwert kann nicht direkt bestimmt werden, da kein Urin vorliegt, der frei von alkylierten Mercaptursäuren ist. Die Kalibrierung als auch die Bestimmung der NWG und BSG muss deshalb aus Nichtraucherurin erfolgen. Dieses Vorgehen führt bei der Leerwertmethode zwangsläufig zu einer Überbewertung der NWG und BSG, die objektiv mit dem Signal/Rausch-Verhältnis besser bestimmt werden können.

Die Methode zeigt über 3 Größenordnungen lineares Verhalten für alle Analyten. Die Selektivität ist durch die Aufnahme von Fullscan-Massenspektren im Rahmen der „Quantitative Optimization“ bestätigt worden. Aus den LC-MS/MS-Spektren lässt sich ein allgemeines Fragmentierungsmuster ablesen, das schematisch in Tab. 5.4 zusammengefasst ist.

Tab. 5.4: Fragmentierungsmuster der Mercaptursäuren unter HPLC-MS/MS-Bedingungen (Tab. 3.8)

<i>Fragment</i>	<i>MMA</i> <i>m/z</i>	<i>EMA</i> <i>m/z</i>	<i>HPMA</i> <i>m/z</i>	<i>CEMA</i> <i>m/z</i>	<i>iPrMA</i> <i>m/z</i>	<i>HEMA</i> <i>m/z</i>
$[M+H]^+$	178	192	222	217	206 ^a	208 [*]
$[M+H]^+ - [CH_3CONH_2]$	119 [*]	133 [*]	163 [*]	158 [*]	147	149
$[M+H]^+ - [CH_2CO]$	136	150	180	175	164	166
$[M+H]^+ - [CH_3CONH_2 - CO_2]$	75	--	--	114	--	--
$[M+H]^+ - [RSCH_2CH(NH)COOH]$	43	43	--	-- ^b	-- ^b	-- ^b
$[M+H]^+ - [CH_3CONH_2 - HCOOH]$	73	87	117	112	101	103
$[M+H]^+ - [CH_3CONH_2 - HCOOH - C_2H_2]$	47	61	91	--	-- ^b	--
$[M+H]^+ - [RSH]$	130	130	130	130	130	130
$[M+H]^+ - [RSCH_2CHCHCOOH]$	--	59	--	-- ^b	-- ^b	-- ^b
$[M+H]^+ - H_2O$	160	174	204	199	188	190
$[M+H]^+ - [CH_2CO - HCOOH]$	90	104	134	129	118	120
$[M+H]^+ - HCOOH$	132	146	176	171	160	162

a: Ist dominierendes Signal im Spektrum

b: Fragment im Messbereich nicht erfasst

Mit Hilfe der GC-MS-Spektren der Methylester sind die Strukturen bestätigt worden. Wie erwartet, nimmt im Gegensatz zu den ESI-Spektren die Intensität des Molekülionenpeaks ab

und die Fragmentierung zu. Auch in diesem Falle lässt sich ein allgemeines Muster erkennen, das in Tab. 5.5 zusammengefasst ist.

Tab. 5.5: Fragmentierungsschema der Mercaptursäure-Methylester (GC-MS-EI, nach 3.5.9 und Tab. 3.2)

<i>Fragment</i>	<i>MMA</i> <i>m/z</i>	<i>EMA</i> <i>m/z</i>	<i>CEMA</i> <i>m/z</i>	<i>iPrMA</i> <i>m/z</i>
$[M]^+$	191	205	230	219
$[M] - [CH_3OH]$	144	--	198	--
$[M] - [CH_3COH_2]$	132	146	171	160
$[M] - [CH_3CONH_2 - CH_3OH]$	100	114	139	--
$[M] - [CH_3CONH_2 - CO_2]$	88	102	--	--
$[M] - [RSH]$	--	--	145	145
$[M] - [RSH - H_2O]$	--	--	--	127
$[M] - [RSH - C_2H_4]$	160	174	199	188
$[M] - [CO_2CH_3 - CH_2CO]$	90	104	129	118

Die Bestimmung stützt sich bei den GC-MS-Spektren auf den Vergleich der berechneten Isotopensignalen mit den tatsächlich gefundenen Werten. Die Intensitäten sind im Anhang 8.3 tabellarisch für die einzelnen Analyten zusammengestellt. Die Übereinstimmung ist in der Regel gut, vor allem die Fragmente mit Schwefel im Molekül lassen sich zweifelsfrei zuordnen. Bei den LC-MS/MS-Spektren fehlt die Angabe der Isotopenpeaks, so dass sich die Bestimmung nur auf die Angabe sinnvoller Fragmente stützen muss. Vergleicht man die gewonnenen Daten mit Literaturangaben, die teilweise allerdings mit unterschiedlichen Ionisierungsverfahren, anderer Polarität und anderen Messgeräten erzielt wurden [85,177,290-292], kann die Identifizierung der eingesetzten Referenzmaterialien als gesichert gelten. Die weiteren Selektivitätskriterien (Varianz der Retentionszeiten und damit einhergehend die Peakweite) sind ebenfalls erfüllt.

Ein großer Nachteil der entwickelten Methode besteht in dem Fehlen deuterierter strukturanaloger Verbindungen, die auf Grund ihrer chemisch äquivalenten Eigenschaften eine weitaus sicherere Quantifizierung und Identifizierung erlaubten, als es in der vorgestellten Methode der Fall ist. Stehen diese Standards zur Verfügung, kann das analytische Verfahren problemlos auf den oder die internen Standards adaptiert werden. Ohne diese deuterierten Standards ist man in einigen Fällen gezwungen, ausgewählte Proben, die an

der Bestimmungsgrenze liegen, mit mehr als einem Ionenübergang pro Analyt nachzumessen, um eine gesicherte Identifizierung zu garantieren.

5.2.2 Vergleich mit Literaturdaten

Die Bestimmung von Mercaptursäuren mittels LC-MS/MS findet immer weitere Verbreitung, vor allem im arbeitsmedizinischen Bereich. Die Bestimmung der Metaboliten ist relativ schnell, ermöglicht einen hohen Probendurchsatz und gestattet eine sehr selektive Bestimmung. Meist werden Methoden entwickelt, die auf einzelne, ganz spezielle Metaboliten ausgerichtet sind [174,175,293-295], nur selten werden Sammelmethoden entwickelt [164,176,296] oder das intakte Glutathion-Konjugat bestimmt [297]. Für die Beurteilung der Alkylierung anhand der Mercaptursäureausscheidung gibt es nur Einzelmethoden, die LC-MS oder LC-MS/MS gestützt quantifizieren [173,292,298].

In Tabelle 5.6 werden Literaturdaten, die mit unterschiedlichen Aufarbeitungs- und Messmethoden erzielt wurden, den hier gemessenen Werten der PAH-96-Studie gegenübergestellt.

Für die einzelnen Analyten gibt es bis auf HPMA keinen Zusammenhang zum Rauchstatus. Zwar zeigen bei MMA die Mittelwerte eine Zunahme von Nichtraucher bis hin zur Gruppe der Raucher, und dieser Effekt ist noch deutlicher, wenn man die Mediane vergleicht, aber der Streubereich innerhalb der Gruppen ist so groß, dass eine deutliche Überlappung der Werte gegeben ist. Gleiches gilt, wenn man die Mediane bei EMA vergleicht. Bei CEMA ist immerhin ein Trend zu erkennen ($p = 0,180$), auch hier ist die Streuung der Messwerte innerhalb der Gruppen groß. Vergleicht man die Nicht- und Passivrauchergruppe insgesamt mit den Rauchern, ergibt sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied. Für HEMA sind die Messwerte der Passivraucher sogar höher als die der beiden anderen Gruppen, hier kann jedoch ein Einfluss der Ernährung vorliegen. Zusätzlich sind die Gruppen ($N = 23$, $N = 19$ und $N = 27$) relativ klein.

Tab. 5.6: PAH-Studie im Vergleich mit Literaturdaten

Quelle	MMA [µg/24 h]		EMA [µg/24 h]		HPMA [µg/24 h]		CEMA [µg/24 h]		HEMA [µg/24 h]	
	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R
ABF	62,4	75,0	14,5	14,8	577,7	1685,5	1444,1	1864,8	527,4	548,5
Eskinja et al. [166]	-	-	* ^a	* ^a	-	-	-	-	-	-
Ivanov et al. [217]	-	-	-	-	-	-	* ^b	* ^b	-	-
Vermeulen et al. [299]	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*
Popp et al. [167]	-	-	-	-	-	-	-	-	Kontrolle 33 ^c	Exponiert 558
Stanek et al. [292]	* ^d	*	-	-	*	*	-	-	-	-
Mascher et al. [173]	-	-	-	-	812 ^e	2809	-	-	-	-
Toyo'oka et al. [164]	-	-	* ^f	*	-	-	-	-	-	-
Lewalter et al. [82]	-	-	-	-	-	-	Kontrolle < 200 ^g	Exponiert ≤ 37000	-	-

a: Nur Methode entwickelt (HPLC mit nachgeschalteter Derivatisierung und Fluoreszenzdetektion)

b: Methode mit GC-MS-Detektion zur Bestimmung von Hb-Addukten nach Oxidation des Analyten zu Sulfoxiden

c: Arbeitsplatzexposition bei Krankenhausangestellten (N = 10) und Kontrollen (N = 10) untersucht. HPLC-Fluoreszenz-Detektion nach alkalischer Hydrolyse

d: Methodenentwicklung zum Nachweis von HPMA und Phenylmercaptursäure (PhMA) mittels Direktinjection oder GC-MS/MS mit MMA als internem Standard; 1 Raucher, 8 Nichtraucher untersucht, HPMA und PhMA-Wert des Rauchers erhöht

e: Methodenentwicklung zur Bestimmung von HPMA in Urin mittels HPLC-MS/MS mit N-Acetylcystein als internem Standard. Die Methode wurde ebenfalls auf Proben der PAH-Studie angewandt, allerdings 5. + 6. Termin gemischt (Raucher N = 27, Nichtraucher N = 41)

f: Methodenentwicklung zur Bestimmung von 11 Mercaptursäuren mittels isokratischer HPLC-Trennung und elektrochemischer Detektion

g: Werte in µg/l Urin, insgesamt 28 Arbeiter

Vergleicht man die Ergebnisse der PAH-Studie mit den o.a. Literaturstellen, zeigt sich, dass die Messwerte mit bereits bekannten Ergebnissen übereinstimmen. Vor allem die Messungen nach Mascher et al. [173] sind interessant, stimmen die Proben doch weitestgehend mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten überein. Die Daten zeigen den gleichen Trend, Raucher scheiden signifikant mehr HPMA aus als Nichtraucher. Die Methode hat jedoch gegenüber der neuentwickelten Sammelmethode einige entscheidende Nachteile. Die Messung mit Elektrospray ist mit den o.g. Nachteilen behaftet, das gewählte Laufmittelsystem führt zu sehr breiten, beinahe nicht-auswertbaren Peaks und der verwendete interne Standard, N-Acetylcystein, neigt abhängig vom pH-Wert zu Dimerisierungen oder mehrfach geladenen Spezies, zumindest unter den methodischen Bedingungen, wie sie in Tab. 3.8 angegeben sind. Deshalb darf die Identität des internen Standards in der Publikation zumindest angezweifelt

werden. Stanek et al. [292] messen ebenfalls HPMA und finden bei einem Raucher ebenfalls höhere Werte, jedoch ist das untersuchte Kollektiv zu klein, um statistisch aussagefähige Werte zu liefern. Popp et al. [167] führen die arbeitsplatzbedingten Werte von HEMA auf die Anwendung von Ethylenoxid zur Sterilisation im Krankenhausbereich zurück. Allerdings ist auch hier die untersuchte Gruppe sehr klein, dennoch sind auf Grund der hohen Exposition die Werte eindeutig in einen Kausalzusammenhang zu bringen.

5.3 Thioether

5.3.1 Analytische Methode

Die hier weiterentwickelte Methode basiert auf einer Publikation von Aringer und Lidums [241]. Die Weiterentwicklung der Methode zu einer Mikromethode hat entscheidende Vorteile. Zum einen wird die Zahl der Messungen pro Probe erhöht (4 Werte parallel pro Probe statt bisher nur einer), zum anderen können bis zu 10 Proben als echte Doppelansätze gleichzeitig vermessen werden. Dadurch wird im Routinebetrieb bei hohem Probendurchsatz Messzeit eingespart. Hinzu kommt, dass die Auswertung der Ergebnisse rechnergestützt erfolgen kann.

Die Vorbereitung der Platten mit Puffer, H₂O oder DTNB geht vor allem durch die Verwendung automatischer Mikroliterpipetten sehr schnell und einfach.

Zwar zeigt sich, dass die absolute Extinktion im Photometer höher ist als im Multikanal-Reader, aber ein Vergleich der beiden Messsysteme ergibt eine übereinstimmende Linearität mit identischer Geradengleichung und daraus resultierender identischer Steigung der Kalibriergeraden. Somit ist das Verfahren trotz der gerätebedingten unterschiedlichen Wellenlänge von 405 nm (Photometer: 412 nm) auf den Multikanal-Reader übertragbar.

Bei der Herstellung der Arbeitslösungen erweist sich vor allem der Phosphatpuffer als problematisch. Die in einer Tabelle nach Sörensen angegebenen Mischungsverhältnisse entsprechen einem pH-Wert von 7,0 oder 7,2, nicht aber dem gewünschten Wert von 7,1. Das angegebene Mischungsverhältnis der beiden Lösungen (0,6 M Na₂HPO₄ und 0,6 M KH₂PO₄) von 70 : 30 kann daher nur als Anhaltspunkt zur Herstellung des Puffers dienen und ist stark vom pH-Wert des verwendeten Wassers abhängig. Die für die Kalibrierung verwendete N-Acetylcystein-Lösung in Wasser zeigt nach zwei oder mehr Tagen starke

Extinktionsabnahmen vor allem in den niedrigen Konzentrationsbereichen. Vermutlich ist die Verbindung in Wasser nicht stabil und sollte daher täglich frisch hergestellt werden.

Bei der Extraktion erweist sich vor allem die Verwendung von 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen als günstig, da sich die Extraktionsansätze in diesen Röhrchen, im Vergleich zu den ursprünglich verwendeten Glaszentrifugenröhrchen mit Schliff, durch einen größeren Durchmesser und damit einer größeren Oberfläche besser auf dem Vortexer durchmischen lassen. Ein weiterer Vorteil ergibt sich bei der Zentrifugation dieser Röhrchen, da sie, im Gegensatz zu den Glaszentrifugenröhrchen, mit Deckel zentrifugiert und leichter entsorgt werden können. Wie in der Literatur von Aringer und Lidums beschrieben [241], ist die Extraktion ein kritischer Schritt in der Methode. So liegt der Variationskoeffizient bei Durchführung einer dreimaligen Extraktion mit 12 % im Vergleich zu 20 % bei zweimaliger Extraktion deutlich niedriger.

Ebenfalls in der Methode nach Aringer und Lidums beschrieben, sollte die Zeit, die vom Öffnen der Röhrchen nach alkalischer Hydrolyse bis zum Mischen der neutralisierten Proben mit DTNB vergeht, möglichst kurz sein. Das schnelle Abpuffern der Proben durch Einbringen in den vorgelegten Phosphatpuffer scheint ein wichtiger Schritt in der Methode zu sein. So sinkt die Ausbeute bei einer Verzögerung von 5 und 15 min um 12 bzw. 15 % [241]. Eine weitere Modifizierung der Methode stellt die Verwendung des LV Evaporators zum Abdampfen der Proben nach erfolgter Extraktion dar. Im Gegensatz zum Rotationsverdampfer können mehrere Proben parallel abgedampft werden, allerdings bei hohem Stickstoffverbrauch. Bei der Einstellung des Stickstoffstromes ist es besonders wichtig, möglichst schonend mit einer niedrigen Stickstoffzufuhr zu beginnen, um zu verhindern, dass das Lösungsmittel mit den Analyten an der Glaswand hochsteigt. Der Stickstoff sollte die Oberfläche durch helicalen Einstrom nur so stark bewegen, dass sich in der Mitte der Lösung eine Art Kegel bildet. In einem Kontrollexperiment konnte gezeigt werden, dass der nach Abdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand bei Lagerung im Coldlab (+4 °C) für 24 h stabil ist. Eine Kontrollprobe (N = 8) zeigt bei sofortiger Aufarbeitung im Mittel (STABW; VK) 25,71 µmol/l Urin (3,3; 12,8 %). Bei Lagerung im Coldlab (N = 6) ergeben sich im Mittel (STABW; VK) 25,36 µmol/l Urin (1,99; 7,8 %).

Ein großer Nachteil des Verfahrens besteht darin, dass ein interner Standard fehlt, auf den die Ergebnisse normiert werden könnten. Somit fehlt ein Hinweis auf die Vollständigkeit der Extraktion, der Spaltung und der Bildung des Farbstoffkomplexes.

Aus diesem Grund sollte zur Validierung der Ergebnisse vor Beginn der Messungen eine Kontrollkarte erstellt werden. Dazu wird eine Kontrollprobe zunächst mindestens 10-fach

bestimmt und deren Mittelwert in die Kontrollkarte eingetragen. Ausgehend vom Mittelwert werden die doppelte und die dreifache Standardabweichung mit eingezeichnet. Die anschließend bei jeder Extraktion ebenfalls mitgeführte Kontrollprobe kann danach in die Kontrollkarte eingezeichnet werden und gibt einen Hinweis darauf, wie gut die Extraktion und die alkalische Hydrolyse im Verlauf eines Tages, bzw. über mehrere Tage verlaufen ist. Allerdings ist die Aussage einer Kontrollkarte nur bedingt richtig, da auch bei der Bestimmung der Kontrollprobe individuelle Fehler auftreten können.

Eine Möglichkeit der weiteren Verbesserung der Methode bestünde in der Verwendung zweier interner Standards. Dabei müsste ein Standard ein Thiol sein, das nicht mehr gespalten werden muss und ein zweiter ein Thioether, mit dessen Hilfe die Vollständigkeit der alkalischen Hydrolyse überprüft werden könnte (z.B. eine Mercaptursäure).

Mit Dotierungsexperimenten in PBS-Puffer mit anschließender Aufarbeitung nach der hier vorgestellten Methode können Aussagen über die Linearität und die Wiederfindungsrate getroffen werden. Zeigt sich dabei eine gute Reproduzierbarkeit, müssten entsprechende Versuche mit matrixbelasteten Proben (z.B. einem Pool-Urin) wiederholt werden. Kann auch für Realproben die Linearität der Dotierexperimente nachgewiesen werden und sind die Wiederfindungsraten ausreichend gut, kommt der Einsatz einer solchen Mercaptursäure in Frage.

Allerdings muss bei der Verwendung eines solchen Standards beachtet werden, dass nicht alle Mercaptursäuren dieselbe Wiederfindungsrate aufweisen und daher nicht automatisch aus einer bekannten Rate auf alle anderen geschlossen werden kann. So zeigt z.B. Methylmercaptursäure nur eine 35 %-ige, aber 2-Cyanoethyl-Mercaptursäure eine 90 %-ige Wiederfindungsrate [156].

Die Methode zeigt eine im Rahmen der Messgenauigkeit liegende Präzision von ca. 16 % bei Nichtraucherproben. Eine Bestimmung der Wiederfindung wird nicht durchgeführt, da die Dotierexperimente immer nur für den verwendeten Analyten Gültigkeit besäßen. Nachweis- und Bestimmungsgrenze werden nach der Leerwertmethode berechnet und sind so weit optimiert, dass Nichtraucherproben sicher quantifiziert werden können. Innerhalb des erwarteten Messbereiches ist die Methode in einem Bereich von 6 bis 360 $\mu\text{mol/l}$ Urin linear. Besondere Beachtung wird bei der Weiterentwicklung auf die Vergleichbarkeit der Messergebnisse mit der bisher verwendeten Photometermethode gelegt. Die zu diesem Zweck durchgeführten Messungen mit frischen Proben einer anderen Studie zeigen ein hohes Mass an Übereinstimmung zwischen den ermittelten Werten (Abb. 4.34).

5.3.2 Vergleich mit Literaturdaten

Die Werte der PAH-Studie werden in Tab. 5.7 Literaturdaten gegenübergestellt.

Tab. 5.7: Thioether-Werte der PAH-Studie im Vergleich mit Literaturdaten

<i>Quelle</i>	<i>Thioether</i> <i>[$\mu\text{mol}/24\text{ h}$]</i>		<i>Thioether</i> <i>[$\mu\text{mol}/\text{g Kreatinin}$]</i>	
	NR	R	NR	R
ABF PAH-Studie	89,4	155,7	68,6	108,8
Scherer et al. [155]				
Studie 1	-	-	77,9 / 71,4 ^a	-
Studie 2	-	-	65,6 / 76,3 ^b	89,7
Malanova et al. [156]				
Stadtgebiet	-	-	41,6	55,8
Industriestadt	-	-	40,7	78,8
Bergdorf	-	-	34,5	55,8
<i>Arbeitsplatzexposition</i>	-	-	<i>Kontrolle</i>	<i>Exponiert</i>
Seutter-Berlage et al. [148]	-	-	478 ^c	ca. 354 / ca. 664
van Doorn et al. [150]	-	-	33,6 ^d	-
Vainio et al. [151]	161	63	230 – 646	265 – 460

a: In Studie 1 wurden nur Nichtraucher mit niedriger ETS-Belastung (N = 14) und hoher ETS-Belastung (N = 32) untersucht.

b: Nichtraucher- (N = 20) und Raucherhaushalte (N = 19). Signifikant höhere Thioetherkonzentrationen bei Rauchern ($p < 0,01$)

c: Vergleich von Arbeitern in chemischer und metallverarbeitender Industrie. Die Mittelwerte der exponierten Gruppen können nur aus Graphiken abgeschätzt werden.

d: Angaben in mmol/mol Kreatinin; 10 Kontrollen, 3 Arbeiter der chem. Industrie, 1 Analytiker.

5.4 DNA-Addukte

5.4.1 Analytische Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Bestimmung der 3-Methyl- und 3-Ethyl-Adeninaddukte aus Humanurin entwickelt. Die Methode gestattet erstmals die selektive und sehr sensitive Messung dieser Analyten mittels HPLC-MS/MS nach entsprechender Probenvorbereitung. Zwar sind in der Literatur bereits einige Methoden zur Bestimmung dieser Addukte publiziert [300-302] jedoch erforderten die Methoden, die im Bereich der Hintergrundbelastung sicher quantifizieren wollten, bisher immer den Einsatz eines Immunoassays, meist mit anschließender GC-MS-Detektion [111,226,230,231,235,303-307]. In den vergangenen Jahren hat die Zahl der Applikationen mit HPLC-MS(/MS) Bestimmungen stark zugenommen [308-310] (siehe auch die dort zitierte Literatur). Dabei werden nicht nur modifizierte Nukleoside, sondern auch freie Basen, Nukleotide und sogar Oligonukleotide gemessen. Gerade für Komponenten mit Molekulargewichten > 400 oder mit thermisch labilen Bindungen (beispielsweise zu Riboseresten oder Phosphatresten) ist die Ionisierung mit ESI die Methode der Wahl [276,311-313], selbst Anwendungen mit verschiedenen Ionisierungsarten für die klinische und forensische Toxikologie sind schon beschrieben worden [314].

Die Bestimmung von DNA-Abbauprodukten im Urin, die in Konzentrationsbereichen von wenigen ppb vorkommen, erfordert zwingend Probenvorbereitung, einerseits, um Matrixkomponenten zu reduzieren, andererseits, um die gewünschten Analyten anzureichern. Im vorliegenden Fall werden 50 ml Urin auf einen neutralen pH-Wert eingestellt, um die gewünschten freien Basen möglichst ungeladen zu erhalten. Die pKa-Werte werden auf 4 - 5 geschätzt, so dass bei einem pH-Wert von 7 - 8 $> 90\%$ als Neutralteilchen vorliegen sollten. Mit dieser Voraussetzung ist es möglich, die Analyten über einfache reversed-phase-Mechanismen auf den MCX-Kartuschen festhalten zu können. Das MCX-Material repräsentiert die sogenannten Mischphasen-Kartuschen, die Festphasenextraktion nach verschiedenen Mechanismen erlauben, in diesem Falle eine Kombination aus reversed-phase- und (strong)-cation-exchange-Mechanismen (RP bzw. (S)CX). Wird der Urin jedoch vor dem Auftragen auf die Kartuschen bereits angesäuert wie klassischerweise in Methodenbeispielen der Kartuschenhersteller vorgeschlagen, konkurrieren die in großem Überschuss vorliegenden anorganischen Kationen mit den in geringen Konzentrationen vorliegenden Analytmolekülen um die freien Sulfonsäure-Bindungsstellen. Der Effekt sind nicht reproduzierbare und stark

verringerte Wiederfindungsraten. Bevor die Analyten auf den Kartuschen über echte Ionenbindungen fixiert werden, kann sogar mit Puffer nachgewaschen werden. Sind die Alkyladenine erst an das SPE-Material fest gebunden, kann mit Lösungsmitteln nachgewaschen werden, wichtig ist nur, vor der eigentlichen Elution die Kartuschen möglichst vollständig zu trocknen. Sind noch Wasserspuren auf der Kartusche, sinkt die Wiederfindungsrate erheblich, da das Elutionsmittel dann nicht in die Poren der SPE-Partikel eindringen kann. Bei der Elution werden die Ionenbindungen gebrochen, und solange der Methanolanteil im Eluenten nicht über 5 % steigt, wird die Matrix so weit reduziert, dass eine Aufkonzentrierung um den Faktor 1250 erreicht wird und eine Messung mit HPLC-MS/MS möglich ist. Die freien Basen erweisen sich als erstaunlich stabil und könnten auch mit Q1-Scans gemessen werden, da sich kaum Fragmentierung beobachten lässt. Nur um die Selektivität zu erhöhen, wird auf die Messung mittels MRM zurückgegriffen. Da die Komponenten thermisch stabil sind, kann mit APCI ionisiert werden, womit gleichzeitig höhere Flussraten gefahren werden können. Allerdings kann im Falle der 3-Alkyladenine nicht auf eine vorgelagerte chromatographische Trennung verzichtet werden, da die Peaks sonst nicht auswertbar sind. Um scharfe Peaks zu erzielen, die nicht mit der Lösungsmittelfront von der Säule eluieren, muss die Auftrennung über ein Gradientenprogramm erfolgen, was zur Folge hat, dass die Analysenzeit steigt, da die Säule rekonditioniert werden muss. Die gewählten Bedingungen stellen hohe Anforderungen an das HPLC-Säulenmaterial, findet doch Reversed-phase-Chromatographie unter extremen Bedingungen statt. Als die Säule der Wahl hat sich Synergi Max-RP erwiesen, die durch ihre spezielle Oberflächenbehandlung in der Lage ist, über größere Probenserien trotz des hohen Wasseranteils des Gradientenprogramms Auflösung und Trennleistung aufrechtzuerhalten. Die große Oberfläche und die kurzen C12-Alkylketten der Max-RP führen zu einer ähnlichen Retention und Methylengruppenselektivität wie bei konventionellen C18-Phasen, da die C12-Ketten sterisch weniger anspruchsvoll sind und damit eine bis zu 25 % höhere Oberflächenbedeckung des Basiskieselgels erreicht wird als mit üblichen C18-Liganden. Daraus resultieren weniger Silanolwechselwirkungen der Analyten und als Folge davon eine verbesserte Peakform. Die bessere Abschirmung des Basiskieselgels ermöglicht die Verwendung neutraler Laufmittelgemische, so dass die basischen Analyten besser mit der Alkylkette in Wechselwirkung treten können als das beispielsweise in einem sauren Laufmittelsystem der Fall wäre, in dem die Analyten protoniert vorlägen. Die Partikelgröße von 4 µm trägt entscheidend zu der hohen Effizienz der Trennung bei [315], da die van Deemter-Kurve, die die Abhängigkeit einer chromatographischen Säule in Abhängigkeit der

eingestellten Flussrate beschreibt, für kleinere Partikel bei deutlich höheren Flussraten ein Minimum durchläuft.

Für die DNA-Adduktmethode sind die Validierungsparameter bestimmt worden, die auch bei den vorangegangenen Methoden festgelegt waren. Die Präzision der Methode unter Wiederholbedingungen sowohl in der Serie als auch von Tag zu Tag sind sehr gut über den gesamten erwarteten Konzentrationsbereich. Die absolute Wiederfindungsrate kann zumindest aus PBS-Pufferproben angegeben werden und ist mit 87 % für 3-Ethyladenin ebenfalls sehr gut, mit durchschnittlich 61 % für 3-Methyladenin zumindest zufriedenstellend. Diese Werte lassen sich allerdings nur bedingt auf Realproben übertragen. Die relativen Wiederfindungsraten, die durch Dotierexperimente mit Poolurinproben bestimmt werden, liegen jedoch abhängig vom Konzentrationsbereich in demselben Bereich bzw. sind quantitativ. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind niedrig genug, dass bis auf wenige Ausnahmen selbst die Hintergrundbelastung bei unbelasteten Nichtrauchern erfasst werden kann, und das bei einem linearen Bereich, der für die Analyten eine ganze Größenordnung auseinanderliegt. Die Nachweisgrenze liegt gegenüber einer publizierten GC-MS-Methode [230] um den Faktor 10 – 20 niedriger, je nach Addukt. Die Bestimmung der Selektivität erfolgt auch in diesem Falle vor allem über die massenspektrometrische Charakterisierung der Analyten mittels LC-ESI-MS/MS und GC-MS-EI (Abb. 4.35 – 4.39). Charakteristisch für die Ethyl-Addukte ist die McLafferty-Umlagerung des Alkylrestes an der N3-Position, die zu Wasserstoff- bzw. Deuteriumanlagerung an der N9-Position unter Abspaltung von Ethen respektive [D₄]-Ethen führt. Bedingt wird diese Umlagerung noch durch die relativ gespannte sp²-Hybridisierung an C-4, die dazu führt, dass der 5-Ring aus der gedachten Ebene herausragt, wodurch sich die Orbitale des freien Elektronenpaares an N-9 und die Wasserstofforbitale des Alkylrestes annähern. Diese Fragmente stellen in allen LC-MS-3-Ethylspektren den dominierenden Fragmentpeak dar, im Falle der GC-MS-Spektren sogar das dominierende Signal im Spektrum. In allen Fällen ist das entstehende Molekülfragment aromatisch und deshalb sehr stabil [316]. Im Falle des 3-Ethyladenins erfolgt sukzessive Abspaltung eines Ammoniak-Neutralteilchens gefolgt von einer [HCN]-Abspaltung zu einer positiv geladenen Spezies mit m/z 92. Die strukturanaloge deuterierte Verbindung [D₅]-3-EtAde zeigt eine mono-deutero-Ammoniakspezies, die beim Übergang von m/z 137 auf m/z 119 abgespalten werden muss. Die dieser Reaktion zugrunde liegende Austauschreaktion ist in der Gasphase durchaus denkbar. Im Anschluss daran fragmentiert das Teilchen weiter unter [HCN]-Abspaltung zu m/z 92 (Abb. 5.6).

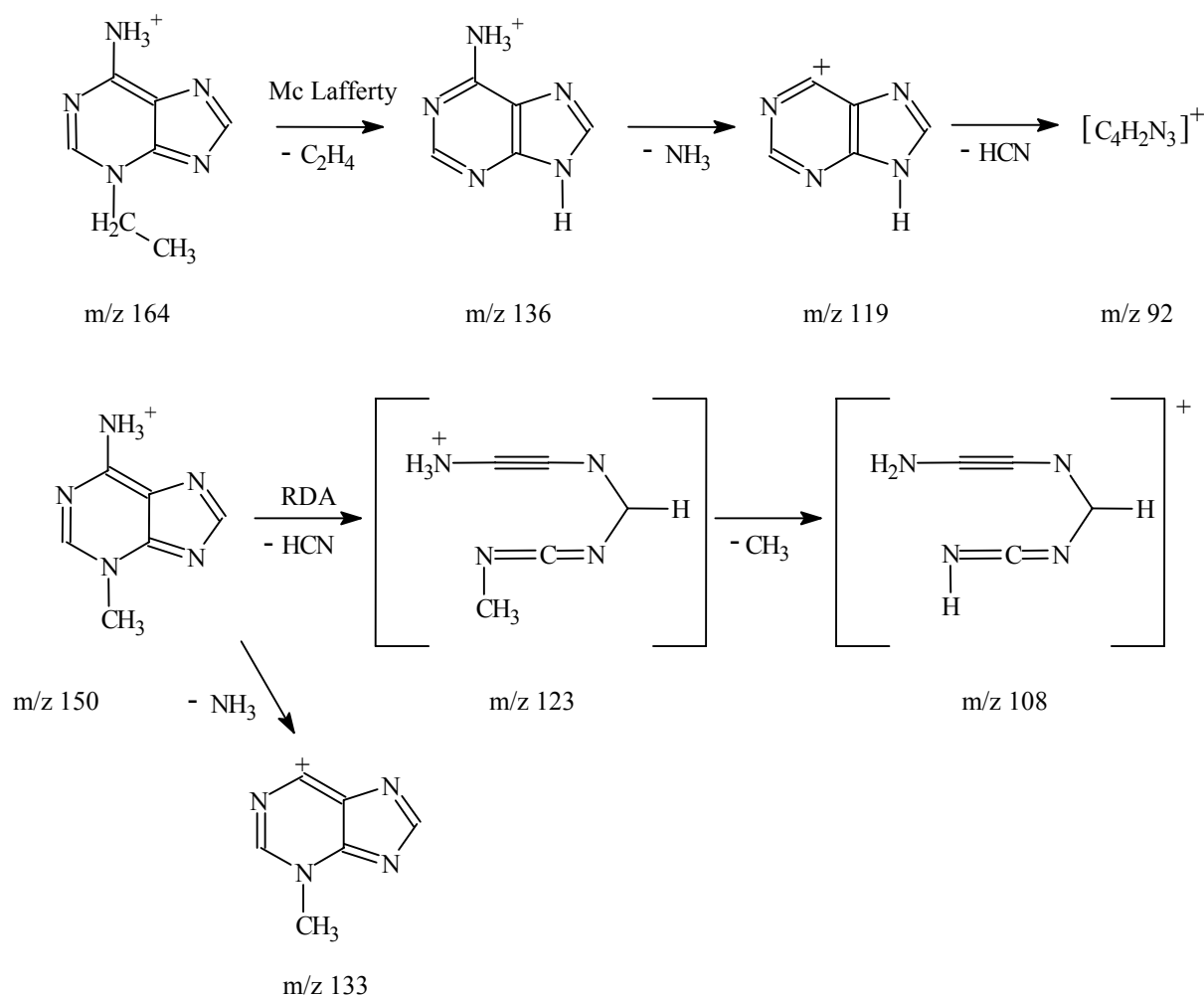


Abb. 5.6: LC-ESI-MS/MS-Fragmentierungsschema der 3-Alkyladenine

Die GC-MS Spektren lassen weitere Interpretationsmöglichkeiten [317] zu. Ausgehend vom dominierenden Signal im Spektrum, m/z 135 bzw. 136, wird in 3 Schritten weiter fragmentiert. Der erste Schritt besteht bei beiden Verbindungen in der Abspaltung von [HCN], die zu m/z 108 bzw. m/z 109 führt. Als Beweis für den oben postulierten Mechanismus kann die nachfolgende Abspaltung von [HCN] bzw. [DCN] zu m/z 81 angesehen werden. In diesen Schritt muss also das Stickstoffatom an Position 9 involviert sein. Daran schließt sich eine weitere Abspaltung von [HCN] an, die für beide Adenine zu m/z 51 führt. Im Falle des 3-Methyladenins ist keine McLafferty-Umlagerung als erster Schritt möglich, da an dem Alkylrest kein γ -H-Atom zur Verfügung steht. Dominierendes Signal ist deshalb m/z 133, das durch Abspaltung von NH_3 entsteht, wodurch das relativ stabile Ringsystem und damit die Aromatizität erhalten bleibt. Die weiteren Signale lassen sich durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion unter Eliminierung von [HCN] aus dem

Pyrimidinring erklären (m/z 123), wobei die Bindung zwischen C-4 und C-5 gelöst werden muss, gefolgt von Abspaltung der Methylgruppe zu m/z 108 (Abb. 5.7). Auf die Berechnung der Isotopensignale der GC-MS-Spektren wird verzichtet, da keine nennenswerten $[A+2]$ -Signale zu erwarten sind.

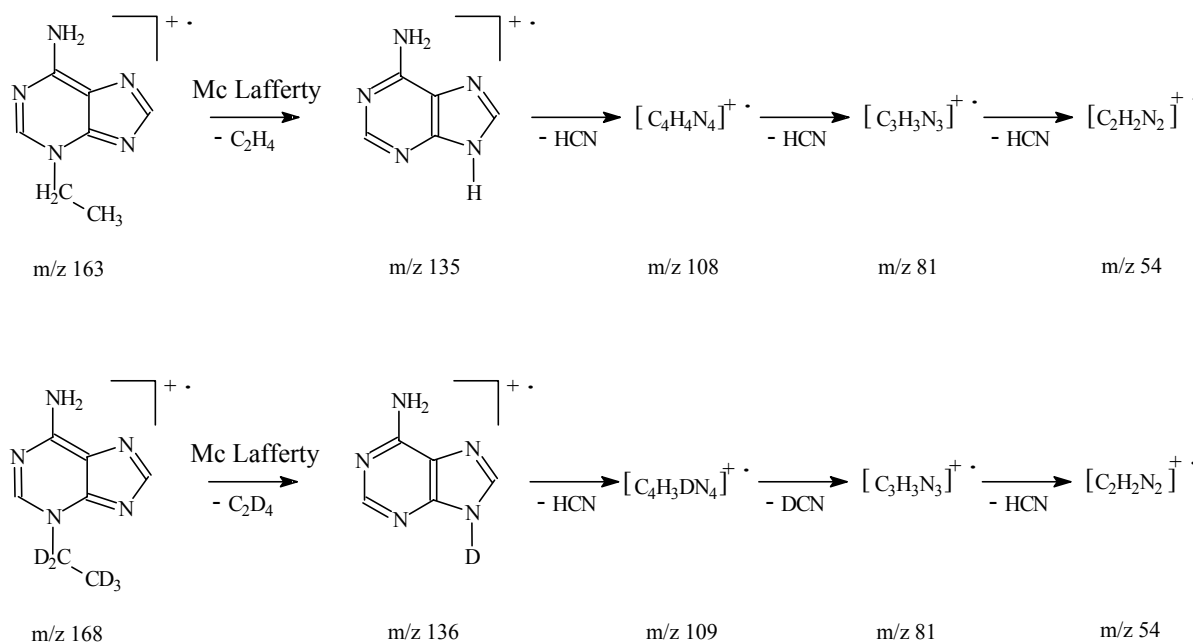


Abb. 5.7: GC-MS-EI-Fragmentierungsschema von 3-EtAde (oben) und $[D_5]$ -3-EtAde

Durch den Einsatz von 9-Ethyladenin als Retentionszeitmarker ist es möglich, die Parameter Retentionszeit und damit einhergehend Peakweite sehr genau zu verfolgen. Mit einer Abweichung unter 0,2 % sind die Kriterien voll erfüllt.

Die neuentwickelte Methode ist in der Lage, Biomarker der Alkylierung zu bestimmen, die im Falle beruflich nicht-exponierter Probanden im Hintergrundbereich liegen. Ein Anstieg der alkylierten Spezies, wie er durch Tabakrauchexposition erreicht wird, kann sicher differenziert werden. Die ermittelten Werte weisen zwischen der Gruppe der Nicht- und Passivraucher sowie der Gruppe der Raucher hoch signifikante Unterschiede auf (3-MeAde $p < 0,001$; 3-EtAde $p = 0,002$).

5.4.2 Vergleich mit Literaturdaten

In Tab. 5.8 werden die ermittelten DNA-Adduktlevel mit Literaturdaten verglichen.

Tab. 5.8: PAH-Studie im Vergleich mit Literaturdaten

<i>Quelle</i>	<i>Kollektiv</i> (<i>N</i>)		<i>3-MeAde</i> [$\mu\text{g}/24\text{ h}$]		<i>3-EtAde</i> [$\text{ng}/24\text{ h}$]	
			NR	R	NR	R
ABF	42	27	4,3	10,5	36,0	132,2
Lawley et al. [317]	-	-	-	-	- ^a	- ^a
Kopplin et al. [303]	5	5	4,7 – 5,9 ^b	5,2 – 14,8 ^b	13,7 – 31,3	16,1 – 138,5
Friesen et al. [231]	-	-	* ^c	*	-	-
Prevost et al. [304]	-	1	-	11,6 – 17,1 ^d	-	16,3 – 65,2
	-	3		11,3 – 17,7		32,6 – ca. 195,6
Shuker et al. [111]	-	-	< 14,9 ^e	-	< 0,3	-
Shuker et al. [226]	-	-	4,5 – 16,0	-	-	-
	2	-	6,1 – 15,4	-	-	-
Prevost et al. [230]	3	-	8,9 – 13,3 ^f	-	86,4 – 195,6	-
			0,3 – 0,4	-	34,2 – 55,4	-

a: Nur Methode entwickelt (HPLC/UV bzw. MS); Alkylierungsversuche

b: Studie mit kontrollierter Passivrauchbelastung; weitere Details im Text

c: Nur immuno-affinitätschromatographische Methode entwickelt; Messung mit GC/MS

d: 2 Studien mit Kontrolle der gerauchten Zigaretten; Werte können nur graphisch abgelesen werden

e: Review-Artikel stellt verschiedene Methoden der Quantifizierung vor

f: Werte einmal ohne (oben) und mit (unten) kontrollierter Diät

Vergleicht man die Ergebnisse der PAH-Studie, die die bislang größte Studie mit diesen Biomarkern darstellt, mit den o.a. Literaturstellen, zeigt sich, dass die Messwerte mit bereits bekannten Ergebnissen übereinstimmen. Da in der Literatur keine größeren Studien beschrieben sind, müsste die statistische Aussagekraft dieser beiden Biomarker anhand noch größerer Studien belegt werden.

5.5 Genereller Zusammenhang der Biomarker

5.5.1 Einfluss des Rauchverhaltens

Die Belastung mit bestimmten Alkylantien ist beim Aktivrauchen gegenüber einer Belastung durch Passivrauchen oder reinen Nichtrauchern eindeutig erhöht. Im Falle der Hämoglobinaddukte lässt sich dieser Effekt bei MeVal, HyEtVal und CyEtVal beobachten. Bei den Mercaptursäuren ist ein signifikanter Anstieg bei MMA und HPMA sowie bei der Gesamt-Thioetherausscheidung zu erkennen. Die Adduktlevel der 3-Alkyladenine in Urin sind bei Aktivrauchern ebenfalls erhöht. Diese Aussage gilt für die genannten Biomarker auch dann, wenn die jeweiligen Mediane herangezogen werden. Am deutlichsten ist der Unterschied bei CyEtVal festzustellen, was allein auf die Aufnahme von Acrylnitril aus dem Tabakrauch zurückzuführen ist. Da eine arbeitsplatzbedingte Exposition ausgeschlossen werden kann und in der Literatur Hinweise auf weitere Quellen (z.B. aus der Nahrung fehlen), kann eine selektive Zuordnung erfolgen. In mehreren Studien ist der Versuch unternommen worden, einen Anstieg der Valin-Hb-Adduktrate pro Zigarette auszudrücken, da in der Regel, wie auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden kann, eine Korrelation zwischen der Anzahl gerauchter Zigaretten und den gemessenen Adduktleveln besteht, so beispielsweise bei HyEtVal [185,188,190,196,202,271], MeVal [196] und CyEtVal [81,182,185]. Allerdings gibt es auch Studien, in denen kein Zusammenhang gefunden wird (HyEtVal vs. Zigaretten [181,198]). In den Fällen, in denen Schwangere untersucht werden, kann ein eindeutiger transplazentarer Transport des Acrylnitrils anhand der CyEtVal-Addukte der Babies pränatal oder nach der Geburt nachgewiesen werden [81,195], gleiches gilt für Vorläufer des HyEtVal-Adduktes [198]. In einer Arbeit von Tavares et al. [81] wird sogar eine Korrelation zwischen der Zahl gerauchter Zigaretten der Mütter mit der Adduktrate ihrer Neugeborenen gefunden ($r = 0,633$; $p = 0,020$). In dieser Arbeit werden keine Korrelationen zwischen den HyEtVal- und CyEtVal-Addukten gefunden. Errechnet man für die vorliegende Studie die Zunahme der Adduktrate pro Zigarette und Tag, ergeben sich für MeVal 0,2 pmol/g Globin, HyEtVal 0,4 pmol/g Globin und CyEtVal 0,5 pmol/g Globin gegenüber der Gruppe der Nichtraucher. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass dieser Berechnung der Mittelwert der gerauchten Zigaretten über alle 6 Termine zugrunde liegt und als Raucher auch Probanden gelten, die max. 1 – 2 Zigaretten täglich konsumieren bzw. Probanden mitenthalten sind, die auf Grund ihrer hohen Cotininwerte nicht als Passivraucher gelten können, obwohl sie angeben, nicht selbst aktiv zu rauchen. In der Literatur sind entsprechende Äquivalente

angegeben für HyEtVal von 11 pmol/g Globin pro Zigarette pro Tag [196] und 7,1 pmol/g Globin pro Zigarette pro Tag [202]. Boogaard et al. [190] ermitteln in einer Studie bei 13 Rauchern einen Anstieg des HyEtVal-Adduktlevels von 9,4 pmol/g Globin pro Zigarette und Tag. Für CyEtVal finden sich entsprechende Werte von 4,5 – 9 pmol/g Globin pro Zigarette pro Tag [197], für MeVal von 42 pmol/g Globin pro Zigarette und Tag [196]. In den genannten Literaturstellen ist die tägliche Zigarettenzahl mit mindestens 10 Zigaretten angegeben. Für die Mercaptursäuren MMA und HPMA sowie der Gesamt-Thioetherausscheidung lässt sich ein entsprechender Anstieg der Werte feststellen. Der deutlichste Zusammenhang wird bei HPMA mit einer Zunahme von 1,6 µg/24 h Urin pro Zigarette und Tag festgestellt gegenüber einer Zunahme von nur 0,1 µg/24 h Urin pro Zigarette und Tag bei MMA oder einem Anstieg der Thioetherausscheidung von 0,2 µmol/g Kreatinin pro Zigarette und Tag. Im Falle der Hydroxypropylmercaptursäure (HPMA) ist der deutliche Effekt sehr wahrscheinlich auf die Exposition gegenüber Acrolein zurückzuführen. Die hinsichtlich ihrer Vorläufersubstanzen unspezifischeren 3-Methyl- und 3-Ethyladeninaddukte sind bei Rauchern signifikant erhöht. Diese Beobachtung wird durch Literaturdaten gestützt [111,235,303,304,307,318], allerdings ist die hoch signifikante Korrelation bei 3-Methyladenin nicht unbedingt zu erwarten, da dieses Addukt stärkeren Beeinflussungen durch andere exogene und endogene Quellen unterworfen ist [226], während 3-Ethyladenin nur wenig von Nahrungsgewohnheiten beeinflusst wird [111,230]. Dass ein deutlicher Zusammenhang der oben genannten Biomarker zum Aktivrauchen besteht, wird durch die Korrelationen der Biomarker untereinander bestätigt. Könnte im Falle einer Korrelation eines Biomarkers, beispielweise mit Cotinin als „klassischem“ Rauchmarker, bei relativ kleinen Probandenzahlen zufällig zu falsch positiven Ergebnissen führen, so zeigen doch die hier dargestellten umfassenden Beobachtungen trotz des relativ kleinen Kollektivs deutliche Zusammenhänge an. Bei einigen Probanden stehen die gemessenen Werte in einem direkten Zusammenhang, beispielweise bei Cotinin im Urin und den 3-Alkyl-DNA-Addukten. Unklar bleibt weiterhin der Einfluss ethylierender Agenzien aus dem Tabakrauch. Während bei den Hämoglobinaddukten und den Mercaptursäuren keine Erhöhung der Werte festgestellt werden kann, sind die 3-Ethyladeninlevel signifikant erhöht. Das setzt eine Beteiligung ethylierender Spezies voraus. Als eine mögliche Quelle kommt Urethan (Ethylcarbamat) in Frage, allerdings ist die aufgenommene Menge (bei 20 Zigaretten täglich 400 – 760 ng, 4,4 – 8,5 nmol) zu gering, um den Anstieg der Adduktrate zu erklären. Urethan wird nur zu 0,13 % zur entsprechenden Ethylmercaptursäure umgewandelt. Weitere im Tabak oder Tabakrauch vorkommende ethylierende Stoffe spielen mengenmäßig ebenfalls keine entscheidende Rolle

(*N*-Nitrosomethylethylamin (NMEA) < 6 ng pro Zigarette im HS, *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) < 4 ng/Zigarette), allerdings ist fraglich, ob im Falle des NDEA nicht Artefakte gemessen wurden. Tricker et al. [319] finden bei der Analyse von Hauptstromrauch kein NDEA und widerlegen damit frühere Ergebnisse von Brunnemann et al. [320] als Falschinterpretation eines Nitroalkans bei der Analyse mittels GC-TEA. Bei diesem Messsystem können sowohl von Nitro- als auch Nitrosoverbindungen durch Pyrolyse die funktionellen Gruppen abgespalten werden und nach Reaktion mit Ozon zu elektronisch angeregtem NO durch Chemolumineszenz detektiert werden [321]. Das im Tabakrauch vorkommende 1-Nitropentan hat unter den vorwiegend angewandten analytischen Verfahren eine ähnliche gaschromatographische Retentionszeit wie NDEA und kann somit leicht mit diesem verwechselt werden. Auch in Publikationen, die Zigaretten mit wesentlich höheren Werten an flüchtigen *N*-Nitrosaminen untersuchen als in Europa oder den Vereinigten Staaten üblich [322], wird NDEA nicht gefunden. Somit bleibt der Nachweis von NDEA auch in neueren Publikationen zumindest widersprüchlich [323,324]. Ausgehend von diesen Ergebnissen kann als mögliche Quelle eine endogene Bildung ethylierender Spezies nicht ausgeschlossen werden. Ein vor kurzem präsentiertes Poster von Chen et al. [270] gibt zwar einen Zusammenhang zwischen Aktivrauchen und Ethylvalinaddukten an, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die ermittelten Ergebnisse methodischen Unsicherheiten unterliegen (siehe 5.1.1). Auch diese Arbeit gibt keine Hinweise auf mögliche Quellen der ethylierenden Spezies, so dass bis zur weiteren Klärung möglicher Vorläufersubstanzen oder einer genaueren Kenntnis endogener Metabolismen nur Spekulationen angestellt werden können. Im Gegensatz dazu ist die Methylierung auf zu viele unterschiedliche Vorläufer zurückzuführen, als dass sie sich als spezifischer Marker empfehlen könnte. Neben den in Kap. 1 genannten Substanzen ist auch eine endogene Bildung methylierender Spezies anzunehmen.

Erklärungsbedarf besteht auch angesichts der selbst bei Nichtrauchern sehr hohen gemessenen Cyanoethylmercaptursäurelevel. Die Werte können nicht auf die alleinige Exposition gegenüber Acrylnitril durch Tabakrauch oder ETS-Belastung zurückzuführen sein. Eine arbeitsplatzbedingte Belastung kann nach Auswertung der Fragebögen ebenfalls ausgeschlossen werden. Vergleicht man die Mediane der Gruppen miteinander, ist zwar ein leichter Trend $R > PR > NR$ zu erkennen, die Streubereiche sind jedoch zu groß, um gesicherte Aussagen zuzulassen. Selbst wenn die Nicht- und Passivraucher Acrylnitril ausgesetzt waren (über ETS-Werte von Acrylnitril liegen keine Daten vor), ist die Bilanz

zwischen Ausscheidung und Aufnahme nicht stimmig. Vielleicht sind auch in diesem Falle endogene Mechanismen für die Bildung cyanoethylierender Spezies verantwortlich.

5.5.2 Einfluss der ETS-Exposition

Die Marker CyEtVal, HPMa und 3-EtAdE erweisen sich als spezifisch für Tabakexposition bei Aktivrauchern, nicht jedoch zur Abschätzung des Risikos der Passivrauchexposition. CyEtVal lässt zwar einen deutlichen Unterschied der Mittelwerte zwischen reinen Nichtrauchern und passivrauchexponierten Nichtrauchern erkennen, die Mediane unterscheiden sich jedoch überhaupt nicht. Der höchste gemessene Nichtraucherwert liegt weit über dem Mittelwert der Passivrauchergruppe. Erschwerend kommt hinzu, dass viele der Werte der Nicht- und Passivrauchergruppen an der Bestimmungsgrenze liegen, wodurch die Quantifizierung erschwert wird (Abb. 5.8). Bei HPMa ist der Trend zu einer Erhöhung der Werte von NR zu PR deutlicher und auch die Mediane heben sich stärker voneinander ab, auch in diesem Fall ist der Überlappungsbereich zwischen den beiden Gruppen jedoch zu groß, so dass keine statistisch signifikante Erhöhung durch Passivrauchen festgestellt werden kann (Abb. 5.9). Die fehlende Signifikanz der Werte kann natürlich auf die relativ kleine Probandenzahl in den Gruppen zurückzuführen sein. Bei einer größeren Studie sind durchaus signifikante Unterschiede möglich. 3-EtAdE zeigt für Nicht- und Passivraucher identische Werte, der Median der Passivraucher liegt sogar niedriger als der Median der Nichtraucher (Abb. 5.10).

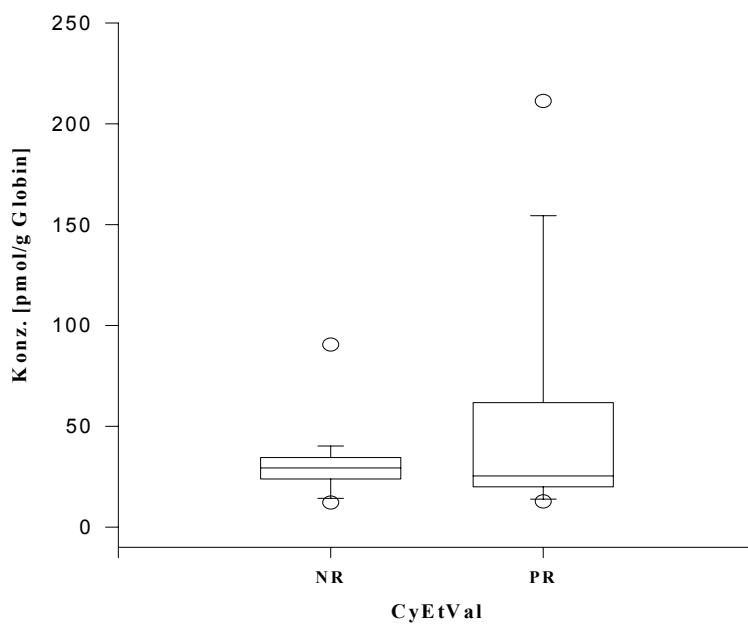


Abb. 5.8: Vergleich der Nicht- und Passivraucher der PAH-Studie für CyEtVal

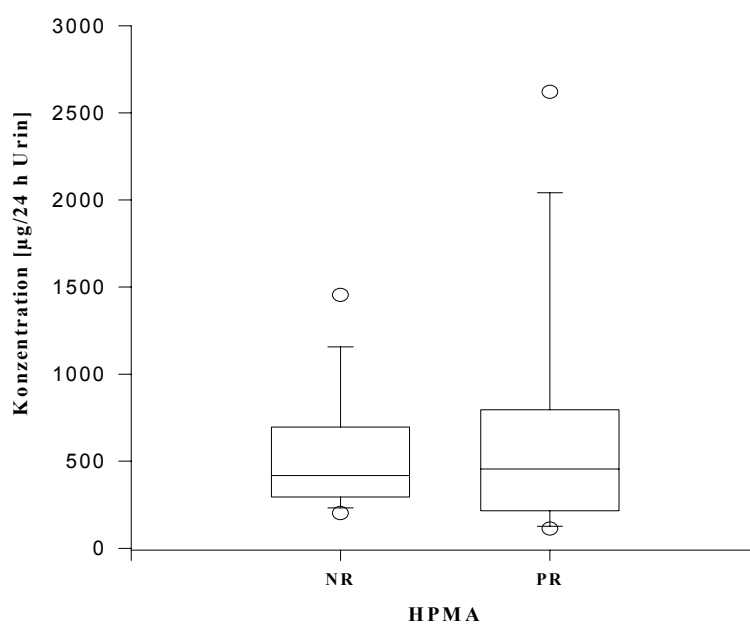


Abb. 5.9: Vergleich der Nicht- und Passivraucher der PAH-Studie für HPMa

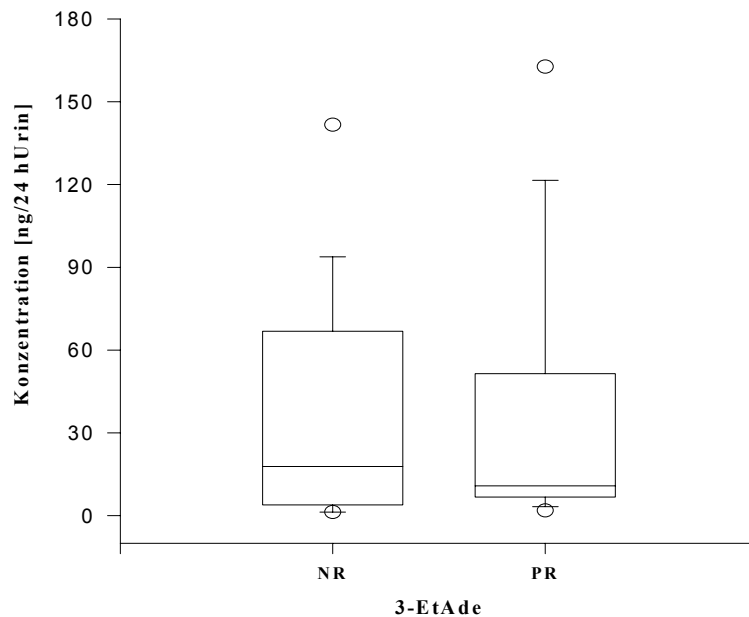


Abb. 5.10: Vergleich der Nicht- und Passivraucher der PAH-Studie für 3-EtAde

Die horizontalen Linien innerhalb der Kästen repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken nach unten und oben die 5. und 95. Percentile. Innerhalb der Kästen liegen 80 % der Messwerte. Wie in einer früheren experimentellen Untersuchung mit kontrollierter hoher ETS-Exposition bereits angedeutet [303], kann keine Zunahme der Ausscheidung von 3-Methyl- oder 3-Ethyladenin gefunden werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Marker nicht als Indikatoren einer Passivrauchbelastung geeignet sind, es sei denn, es gelingt, die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für CyEtVal noch weiter zu verbessern. Für die Erfassung der Schadstoffbelastung durch Passivrauchen bieten sich andere Marker an, so beispielsweise die Bestimmung der NNK-Belastung durch Messung des spezifischen Biomarkers NNAL und seines Glucuronids im Urin, die Messung von Nikotin auf Passivdiffusionssammlern oder die Bestimmung von Cotinin im Urin [325]. Cotinin hat sich als der geeignetste Biomarker in verschiedenen Körperflüssigkeiten erwiesen [31,326] und erlaubt eine quantitative Aussage über die Nikotinaufnahme durch Passivrauchen (ca. 0,5 – 1 % der von Rauchern). Bei sehr hoher, experimenteller Belastung mit ETS werden zwischen ETS-exponierten und nicht ETS-exponierten Nichtrauchern zwar Unterschiede in der Thioetherausscheidung gemessen [27], wird aber eine Belastung unter realen Bedingungen zugrunde gelegt, sind, wie in der vorliegenden Arbeit, keine Unterschiede festzustellen [155].

Bei Rauchern ist eine Erhöhung der Thioetherausscheidung als Marker der vermehrten Aufnahme elektrophiler Substanzen allgemein bekannt und wird mit den vorliegenden Daten auch bestätigt. Gut abzulesen ist auch der zunehmende Beitrag von HPMa an der Gesamt-Thioetherausscheidung von der Nichtraucher- hin zur Rauchergruppe. Während er bei den Nichtrauchern noch 2,86 % beträgt, steigt er bei der Rauchergruppe auf 4,89 %.

5.5.3 Auswirkung der Ernährungsweise

Der Einfluss der Ernährungsgewohnheiten ist bei Rauchern schwieriger einzuschätzen als bei Nichtrauchern. Dass bei Rauchern die Hämoglobin- und DNA-Addukte sowie zumindest 2 Mercaptursäuren signifikante Abhängigkeiten zeigen, ist wohl eher mit allgemeinen Ernährungsgewohnheiten bei Rauchern zu erklären. Raucher trinken statistisch gesehen wesentlich mehr Kaffee als Nichtraucher. Zumindest scheinen Vorläufersubstanzen im Kaffee enthalten zu sein, die zur Bildung der Ethylmercaptursäure führen, denn auch bei den Nichtrauchern lässt sich ein eindeutiger Effekt beobachten. Die Ernährungsweise von Nichtrauchern ist im allgemeinen „gesünder“ als die von Rauchern. So ist anhand der Ernährungsprotokolle eindeutig abzulesen, dass die Nichtrauchergruppe mehr Fisch, Obst, Gemüse und Salat konsumiert als die Rauchergruppe. Als ein Effekt davon ist ein schwach signifikanter Zusammenhang zwischen dem Fischkonsum und den MeVal-Addukten zu beobachten. Um Nahrungseffekte auf Biomarkerlevel jedoch eindeutig zuordnen zu können, wäre eine standardisierte Diät notwendig, die die Aufnahme von Vorläufern alkylierender Verbindungen gezielt minimiert. Dazu müssten die Probanden jedoch quasi kaserniert werden. Um so erstaunlicher ist der in einigen Fällen doch deutliche Einfluss der Ernährungsgewohnheiten auf die Biomarker im Rahmen dieser Feldstudie. Als mögliche Erklärung bietet sich an, dass zumindest im Falle der Hämoglobinaddukte ja ein „Steady-state-level“ gemessen wird und aus den einzelnen Protokollen ja die Mittelwerte über alle 6 Termine gebildet werden, so dass die Schwankungsbreiten nicht allzu groß sind.

5.5.4 Einfluss der genetischen Polymorphismen

Der Einfluss der genetischen Polymorphismen ist bei dem relativ kleinen untersuchten Kollektiv nur schwer zu bewerten. Zwar werden bei einigen Markern signifikante Korrelationen zu den Glutathion-S-Transferasen festgestellt, aber die Aussagekraft bleibt wegen der doch kleinen Kollektive begrenzt. Bei Rauchern ist ein Zusammenhang der GSTM1 mit den Mercaptursäuren zu erkennen. So scheiden Personen des GSTM1*0-Genotyps signifikant weniger MMA, EMA und HPMA aus, bei CEMA und HEMA ist ein Trend zu erkennen. Personen des GSTT1*0-Genotyps zeigen höhere Adduktraten bei MeVal und EtVal, allerdings lassen sich bei den korrespondierenden Mercaptursäuren keine Unterschiede erkennen. Die CyEtVal-Adduktrate ist sogar geringer als bei Trägern des Wildtyps. Auch die Kombination von M1*0 und T1*0 scheint einen Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus anzudeuten. Eine auf Grund der Deletion verringerte Fähigkeit zur Konjugation mit Glutathion und eine daraus resultierende verringerte Ausscheidung der Fremdstoffe als Mercaptursäuren scheint eine leichte Erhöhung der Hämoglobinadduktrate bei MeVal hervorzurufen. In allen genannten Deletionen tritt allerdings bei den korrespondierenden DNA-Addukten kein Effekt auf. Nichtraucher zeigen denselben Effekt bei der GSTM1 T1-Deletion. Auch hier lässt sich zumindest ein Trend erkennen, dass eine verringerte Mercaptursäurebildung mit einer leicht erhöhten MeVal-Adduktrate verbunden ist. Ein Einfluss auf die DNA-Addukte wird jedoch nicht beobachtet. Noch deutlicher wird dieser Effekt bei Personen des GSTT1*0-Genotyps. Der Stoffwechselweg in Richtung Mercaptursäure ist durch das fehlende Gen zumindest verringert. Als Folge davon kann vermehrt das Hämoglobinaddukt gebildet werden. Auch in diesem Fall ist keine Erhöhung der DNA-Adduktrate zu beobachten. Bei der Beurteilung der o.g. Ergebnisse ist allerdings immer das kleine Kollektiv zu berücksichtigen. Aus diesem Grunde sind auch keine Auswertungen hinsichtlich der GSTP1-Deletion berücksichtigt worden, da nur 3 Probanden unseres Kollektivs eine entsprechende Deletion aufweisen und somit statistische Aussagen nicht möglich sind. Müller et al. [181] finden bei Rauchern keinen Einfluss des GSTT1- und GSTM1-Genotyps auf die Level der HyEtVal-Addukte, wohl aber bei Nichtrauchern für den GSTT1-Genotyp (Mann-Whitney-Test $p < 0,002$). Die Nichtraucher mit GSTT1*0 zeigen einen Anstieg der Adduktlevel um den Faktor 2. Allerdings ist das untersuchte Kollektiv mit 27 Probanden (davon GSTT1*0: 5; GSTM1*0: 9) noch kleiner als in der hier vorliegenden Studie, was die statistische Aussagekraft schmälert. Es kann jedoch angenommen werden, dass Ethylenoxid ein Substrat für GSTT1, nicht aber für GSTM1 zu sein scheint [327].

Fennell et al. [185] bestätigen die Ergebnisse für GSTM1*0 und HyEtVal-Addukte, finden jedoch für den Null-Genotyp GSTT1*0 nur dann einen Anstieg der Adduktlevel, wenn die Probanden auf den Rauchstatus normiert werden. Dann allerdings soll eine komplette Deletion des GSTT1-Gens einen Anstieg der internen Ethylenoxiddosis um 50 – 70 % bewirken. Dass Ethylenoxid kein Substrat der GSTM1 ist, ist bereits von Farmer et al. [195] auf der Basis von Untersuchungsergebnissen an 49 Frauen postuliert worden. Thier et al. finden in einer neueren Publikation von 1999 bei 59 Arbeitern, die in Kontakt mit Acrylnitril kommen, keinen Einfluss der GSTM1*0-Gens auf die Adduktlevel von HyEtVal oder CyEtVal, wohl aber lässt sich ein Effekt bei Trägern des GSTT1*0-Gens beobachten. Sie zeigen leicht erhöhte Werte der MeVal und HyEtVal-Addukte. Um die Effekte dieser fremdstoffmetabolisierenden Enzyme gesichert darlegen zu können, wären deutlich größere Studien notwendig, die dann auch noch eine ganze Reihe weiterer Enzyme (Phase I und Phase II) berücksichtigen sollten.

5.5.5 Anwendbarkeit der Methoden

Eine abschließende Beurteilung der analytischen Methoden muss die Anwendbarkeit und die Notwendigkeit der Entwicklungen berücksichtigen. Wenn die Zigarettenindustrie den Weg zu einem risikoreduzierten Produkt sucht und von verschiedenen gesetzgebenden Stellen gezwungen wird, Inhaltsstoffe anzugeben (wie beispielsweise in British Columbia (Kanada) oder Massachusetts (USA) bereits der Fall), dann sind analytische Methoden, die in der Lage sind, Dosismarker und biochemische Effektmarker zu messen und damit eine Risikoabschätzung erlauben, unbedingt notwendig bei der Bewertung der Produkte. Vor dem Hintergrund einer neuen EU-Tabakrichtlinie und damit eventuell einhergehenden Forderungen nach Methoden zur Bewertung des individuellen Risikos müssen solche Methoden für den Routineeinsatz geeignet sein und auf hohen Probendurchsatz ausgelegt sein. Je einfacher und selektiver die Analyten bestimmbar sind, desto leichter wird es, eine Vielzahl von Komponenten gleichzeitig zu messen und eine fundierte Risikobewertung vorzunehmen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden können einen Beitrag dazu leisten, zeichnen sie sich doch durch hohen Probendurchsatz, selektive und sehr sensitive Bestimmungen und eine nachgewiesene Anwendbarkeit (mit einem nachgewiesenen Bezug zu Raucheinflüssen) bei vertretbarem Aufwand aus. Wenn noch weitere

Verbesserungen bezüglich deuterierter strukturanaloger Standardverbindungen eingeführt werden, sind diese Methoden wichtige Hilfsmittel im Humanbiomonitoring.

6 Zusammenfassung

Die Belastung des Menschen mit verschiedenen alkylierenden Agenzien ist auf unterschiedliche Quellen zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch ein Biomonitoring insbesondere die Beiträge von Nahrung, Rauchen und Passivrauchen möglichst umfassend geklärt werden. Als Biomarker wurden neben Hämoglobinaddukten methylierender, ethylierender, hydroxyethylierender und cyanoethylierender Precursoren mit dem N-terminalen Valin die korrespondierenden alkylierten Mercaptursäuren gewählt, erweitert um eine hydroxypropyl-alkylierte Mercaptursäure. Zur Erfassung der Gesamtbelastung sollte neben den Mercaptursäuren auch die Thioether-Gesamtausscheidung bestimmt werden. Um das Gesamtbild abzurunden, ist allerdings auch die Erfassung von Addukten auf dem Level der DNA nötig. Diese Marker sollten möglichst mit genetischen Prädispositionen in Verbindung gebracht werden, wobei ein Hauptaugenmerk auf den fremdstoffmetabolisierenden Phase-II-Enzymen der Glutathion-S-Transferasen GSTM1, GSTT1 und GSTP1 lag. Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, geeignete Methoden zum Nachweis der genannten Verbindungen zu entwickeln oder in geeigneter Weise weiterzuentwickeln, so dass unter den Gesichtspunkten der Anwendbarkeit im Humanbiomonitoring im Rahmen einer Studie bei relativ geringem Aufwand, niedrigen Kosten pro Analyse, hoher Selektivität und Sensitivität bei paralleler Gruppenbestimmung ein möglichst effektives Biomonitoring möglich ist. Dazu wurde eine publizierte Methode der DFG zur Bestimmung der Hämoglobinaddukte so weiterentwickelt, dass sie die Simultanbestimmung des Ethylvalinadduktes mittels GC-MS-EI gestattet.

Zum Nachweis der Mercaptursäuren alkylierender Verbindungen aus Humanurin wurde eine neue Methode entwickelt, die sich auf eine einfache Probenvorbereitung durch Festphasenextraktion und anschließende Detektion mittels HPLC-APCI-MS/MS stützt. Die Ionisierung der Analyten durch die APCI-Quelle hat gegenüber einer Ionisierung durch Elektrospray-Verfahren wesentliche Vorteile vor allem im Routinebetrieb. Durch den Einsatz des Tandem-Massenspektrometers und Messung selektiver Ionenübergänge ist eine zuverlässige Identifizierung der gesuchten Komponenten gewährleistet.

Obwohl Bestimmungen der Gesamt-Thioetherausscheidung schon lange bekannt sind, war die Anwendbarkeit der Methodik insofern begrenzt, als die Probenvorbereitung und die Messungen einen für größere Studien nicht vertretbaren Zeitaufwand bedeuteten. Durch die

im Rahmen dieser Arbeit eingeführten Modifikationen ist es möglich, den Arbeitsablauf in den meisten Schritten zu beschleunigen und den Probendurchsatz damit zu erhöhen. Die Kenndaten der Methode werden durch die erhöhte Anzahl an Messungen pro Probe verbessert. Durch den Einsatz eines Multikanalreaders kann die Messung und Auswertung gleichzeitig rechnergestützt erfolgen.

Die Bestimmung von 3-Methyl- und 3-Ethyladenin in Urin als Marker für die Alkylierung der DNA setzte bislang im Bereich einer Hintergrundbelastung den Einsatz immunochemischer Methoden voraus. Durch die neuentwickelte Methode reduzieren sich die Probenvorbereitung und –Anreicherung auf eine Festphasenextraktion. Vorteil davon ist ein erhöhter Probendurchsatz bei reproduzierbaren Bedingungen. Die Messung mit HPLC-APCI-MS/MS gestattet die sichere Quantifizierung selbst unbelasteter Nichtraucherproben mit hoher Genauigkeit. Auch in diesem Falle zeigt die Ionisierung mit APCI bedeutende Vorteile gegenüber der Elektrospray-Ionisation, vor allem bei den bedingt durch die hohe Konzentrierung stark matrixbelasteten Proben.

Im Rahmen einer longitudinalen Feldstudie mit 69 Probanden wurden die Thioether, Mercaptursäuren, sowie die Hämoglobin- und DNA-Addukte alkylierender Verbindungen untersucht. Die Ergebnisse bestätigen andere Studien, wonach Aktivraucher bezüglich der MeVal-, HyEtVal- und CyEtVal-Addukte erhöhte Level aufweisen. Gleiche Resultate sind für die Mercaptursäuren MMA und HPMA, die Thioether-Gesamtausscheidung sowie für die untersuchten DNA-Addukte gefunden worden. Die vom Probanden selbst berichtete Passivrauchbelastung hatte keinen messbaren Einfluss auf die Biomarker der Exposition gegenüber alkylierenden Agenzien. Es wurde auch kein Zusammenhang zwischen der durch Biomonitoring ermittelten Belastung und der durch Cotinin im Urin und Plasma bzw. der objektiv gemessenen Passivrauchbelastung (Nikotin auf Passiv-Diffusionssammlern) gefunden.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Exposition gegenüber alkylierenden Verbindungen aus weiteren exogenen und endogenen Quellen einen wesentlichen Beitrag zur Gesamtexposition leistet. Im Falle der Nahrung sind die Precursoren allerdings in der Regel zu unspezifisch, als dass sie bestimmten biochemischen Effektmarkern zugeordnet werden könnten, so dass keine Effekte beobachtet werden können und eine eventuelle zusätzliche Belastung beispielsweise durch Passivrauchen im Hintergrundrauschen untergeht. Allerdings

lässt sich ein Einfluss der genetisch bedingten Enzymausstattung auf die Level bestimmter Marker feststellen. Vor allem die Träger des GSTT1*0-Gens zeigen eine verringerte Mercaptursäurebildung und ähnlich wie bei doppelten Nullgenotypen GSTM1 T1 vermehrte Bildung von Hämoglobinaddukten, zumindest für methylierende Spezies. Bei hydroxy- und cyanoethylierenden Verbindungen lässt sich allenfalls ein Trend erkennen, der jedoch nicht signifikant ist. Dies ist vermutlich auf die zu geringe Anzahl an Probanden und den Einfluss weiterer im Rahmen einer Feldstudie nicht kontrollierbarer Parameter zurückzuführen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Levin W, Buening MK, Wood AW, Chang RL, Kedzierski B, Thakkers DR, Boyd DR, Gadagomamath GS, Armstron RN, Yagi H, Karle JM, Slaga TJ, Jerina DM, Conney AH (1980) An enantiomeric interaction in the metabolism and tumorigenicity of (+)- and (-)-benzo[*a*]pyrene 7,8-oxide. *J Biol Chem* 255:9067-9074
- [2] Cooper CS, Grover PL, Sims P (1983) The metabolism and activation of benzo[*a*]pyrene. In: Bridges JW, Chasseaud LF (eds) *Progress in Drug Metabolism*, vol 7. John Wiley & Sons Ltd., London (1983):295-396
- [3] Cook JW, Hewett CL, Hieger I (1933) The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Part I, II and III. *J Chem Soc Perkin Trans*:395-405
- [4] Magee PN, Barnes JM (1956) The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br J Cancer* 10:114-122
- [5] Ames BN, Lee FD, Durston WE (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:782-786
- [6] Ames BN, Mccann J, Yamasaki E (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31:347-364
- [7] Marquardt H, Schäfer SG (1994) *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich:1-1004
- [8] Perera FP, Weinstein IB (2000) Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 21:517-524
- [9] Lewalter J, Neumann H-G (1998) *Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte (Biomonitoring)*. Teil XII. Die Bedeutung der individuellen Empfindlichkeit beim Biomonitoring. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 33:352-364
- [10] Dube MF, Green CR (1982) Methods of collection of smoke for analytical purposes. Recent advances in tobacco science. Vol. 8. Formation, analysis, and composition of tobacco smoke. 36th Tobacco Chemists Research Conference, October 24-27, Raleigh, N.C, 1982.
- [11] Wynder EL, Hoffmann D, Gori GB, U.S. Department of Health, Education and Welfare (1975) *Smoking and Health. Band I. Modifying the Risk for the Smoker*. U.S. Government Printing Office, Washington:1-564
- [12] Gaworski CL, Heck JD, Bennett MB, Wenk ML (1999) Toxicologic evaluation of flavor ingredients added to cigarette tobacco: skin painting bioassay of cigarette smoke condensate in SENCAR mice. *Toxicology* 139:1-17

-
- [13] Henningfield JE, Fant RV, Radzius A, Frost S (1999) Nicotine concentration, smoke pH and whole tobacco aqueous pH of some cigar brands and types popular in the United States. *Nicotine & Tobacco Research* 1:163-168
- [14] Klus H, Kuhn H (1982) Verteilung verschiedener Tabakrauchbestandteile auf Haupt- und Nebstromrauch (Eine Übersicht). *Beitr Tabakforsch Int* 11:229-265
- [15] Nelson PR, Conrad FW, Kelly SP, Maiolo KC, Richardson JD, Ogden MW (1998) Composition of environmental tobacco smoke (ETS) from international cigarettes part II: Nine country follow-up. *Environmental International* 24:251-257
- [16] Scherer G, Conze C, Schmid ER, Pachinger A, Adlkofer F (1990) Importance of gas phase and particulate phase constituents in exposure to environmental tobacco smoke (ETS). In: *Indoor Air '90. The fifth international conference on indoor air quality and climate. Toronto, Canada, July 29 - August 3, 1990, vol 2. Canada Mortgage and Housing Corporation, Ottawa, Ontario*
- [17] Scherer G, Conze C, Drexler W, Schmid ER, Adlkofer F (1990) Importance of gas phase and particulate phase constituents in exposure to environmental tobacco smoke (ETS). In: Lunau F, Reynolds GL (eds) *Indoor Air Quality and Ventilation. Selper Ltd, London:195-202*
- [18] Jarczyk L, Scherer G, v.Maltzan C, Luu HT, Adlkofer F (1989) Comparison of intake of nicotine from environmental tobacco smoke between nose and mouth breathers. *Environ Int* 15:35-40
- [19] Guerin MR (1980) Chemical composition of cigarette smoke. *Banbury Report* 3:191-204
- [20] Norman V (1977) An overview of the vapor phase, semivolatile and nonvolatile components of cigarette smoke. *Recent Advances In Tobacco Science. Vol. 3. Tobacco Smoke: Its Formation And Composition. 31st Tobacco Chemists' Research Conference, October 5-7, 1977, Greensboro, North Carolina.*
- [21] Witorsch RJ, Witorsch P (2000) Environmental tobacco smoke and respiratory health in children: A critical review and analysis of the literature from 1969 to 1998. *Indoor Built Environ* 9:246-264
- [22] Wichmann HE, Jöckel K-H, Becher H (1999) Gesundheitliche Risiken durch Passivrauchen - Bewertung der epidemiologischen Daten. *Umweltmed Forsch Prax* 4:28-42
- [23] Wichmann H-E, Jöckel K-H, Becher H (1999) Abschließende Stellungnahme zum Leserbrief von Adlkofer et al. "Gesundheitliche Risiken - Passivrauchen, Bewertung der epidemiologischen Daten". *Umweltmed Forsch Prax* 4:257-258
- [24] Boffetta P, Nyberg F, Agudo A, Benhamou E, Jockel K-H, Kreuzer M, Merletti F, Pershagen GP H, Simonato L, Wichmann H-E, Saracci R (1999) Letter to the editor: "Risk of lung cancer from exposure to environmental tobacco smoke from cigars, cigarillos and pipes". *Int J Cancer* 83:805-806

- [25] Wartenberg D, Calle EE, Thun MJ, Heath jr. CW, Lally C, Woodruff T (2000) Passive smoking exposure and female breast cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* 92:1666-1673
- [26] Scherer G, Ruppert T, Daube H, Kossien I, Riedel K, Tricker AR, Adlkofer F (1995) Contribution of tobacco smoke to environmental benzene exposure in Germany. *Environ Int* 21:779-789
- [27] Scherer G, Conze C, v. Meyerinck L, Sorsa M, Adlkofer F (1990) Importance of exposure to gaseous and particulate phase components of tobacco smoke in active and passive smokers. *Int Arch Occup Environ Health* 62:459-466
- [28] Henningfield JE, Griffiths RR (1979) A preparation for the experimental analysis of human cigarette smoking behavior. *Behavior Research Methods & Instrumentation* 11:538-544
- [29] Baker RR (1980) Mechanism of smoke formation and delivery. *Recent Adv Tobacco Sci* 6:184-224
- [30] Elmenhorst H, Schultz C (1968) Flüchtige Inhaltsstoffe des Tabakrauches (Sonderdruck). *Beitr Tabakforsch Int* 4:90-123
- [31] Scherer G, Richter E (1997) Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): A critical reappraisal. *Hum Exp Toxicol* 16:449-459
- [32] International Agency for Research on Cancer (1986) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Tobacco smoking, vol 38. IARC, Lyon:1-421
- [33] Hoffmann D, Adams JD, Brunnemann KD, Hecht SS (1979) Assessment of tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco products. *Cancer Res* 39:2505-2509
- [34] Klus H, Begutter H, Scherer G, Tricker AR, Adlkofer F (1992) Tobacco-specific and volatile N-nitrosamines in environmental tobacco smoke of offices. *Indoor Environment* 1:348-350
- [35] Brunnemann KD, Fink W, Moser F (1980) Analysis of volatile N-nitrosamines in mainstream and sidestream smoke from cigarettes by GLC-TEA. *Oncology* 37:217-222
- [36] Ohshima H, Nair J, Bourgade M-C, Friesen M, Garren L, Bartsch H (1985) Identification and occurrence of two new N-nitrosamino acids in tobacco products: 3-(N-nitroso-N-methylamino) propionic acid and 4-(N-nitroso-N-methylamino) butyric acid. *Cancer Lett* 26:153-162
- [37] Wynder EL, Hoffmann D (1967) Tobacco and Tobacco Smoke. Academic Press, New York, London:1-730
- [38] Tricker AR (1997) N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *European Journal of Cancer Prevention* 6:226-268

-
- [39] Meger M, Meger-Kossien I, Riedel K, Scherer G (2000) Biomonitoring of environmental tobacco smoke (ETS)-related exposure to 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Biomarkers* 5:33-45
- [40] Ohshima H, Bartsch H (1981) Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. *Cancer Res* 41:3658-3662
- [41] Tricker AR, Preussmann R (1991) Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: Occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat Res* 259:277-289
- [42] Pfundstein B, Tricker AR, Theobald E, Spiegelhalter B, Preussmann R (1991) Mean daily intake of primary and secondary amines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. *Fd Chem Toxicol* 29:733-739
- [43] Pfundstein B, Tricker AR, Preussmann R (1991) Determination of primary and secondary amines in foodstuffs using gas chromatography and chemiluminescence detection with a modified thermal energy analyzer. *J Chromatogr* 539:141-148
- [44] Tricker AR, Kubacki SJ (1992) Review of the occurrence and formation of non-volatile N-nitroso compounds in foods. *Food Add Contam* 9:39-69
- [45] Sen NP (1988) Migration and formation of N-nitrosamines from food contact materials. In: Hotchkiss JH (ed) *Food packaging interactions ACS-Symposium series No. 365*. American Chemical Society, Washington, D.C.:146-158
- [46] Tricker AR, Pfundstein B, Theobald E, Preussman R, Spiegelhalter B (1991) Mean daily intake of volatile N-nitrosamines from foods and beverages in West germany in 1989-1990. *Fd Chem Toxicol* 29:729-732
- [47] Janzowski C, Eisenbrand G, Preussmann R (1978) Occurrence of N-nitrosamino acids in cured meat products and their effect on formation of N-nitrosamines during heating. *Fd Cosmet Toxicol* 16:343-348
- [48] Sen NP, Baddoo PA, Seaman SW, Weber D (1991) 2-(hydroxymethyl)-N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid in smoked meats and bacon and conversion to 2-(hydroxymethyl)-N-nitrosothiazolidine during high-heat cooking. *Journal of Food Science* 56:913-915
- [49] Pensabene JW, Fiddler W (1985) Effect of N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid on formation of N-nitrosothiazolidine in uncooked bacon. *J Assoc Off Anal Chem* 68:1077-1080
- [50] Sen NP, Baddoo PA, Seaman SW (1986) N-nitrosothiazolidine and N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid in smoked meats and fish. *Journal of Food Science* 51:821-825
- [51] Lee JS, Bills DD, Scanlan RA, Libbey LM (1977) 3-hydroxy-N-nitrosopyrrolidine. Isolation from heated 4-hydroxy-N-nitrosoproline. *J Agric Food Chem* 25:422-423

- [52] Janzowski C, Eisenbrand G, Preussmann R (1978) Occurrence and determination of N-nitroso-3-hydroxypyrrolidine in cured meat products. *J Chromatogr* 150:216-220
- [53] Pensabene JW, Feinberg JI, Piotrowski EG, Fiddler W (1979) Occurrence and determination of N-nitrosoproline and N-nitrosopyrrolidine in cured meat products. *Journal of Food Science* 44:1700-1702
- [54] Pensabene JW, Fiddler W, Gates RA, Fagan JC, Wasserman AE (1974) Effect of frying and other cooking conditions on nitrosopyrrolidine formation in bacon. *Journal of Food Science* 39:314-316
- [55] Sen NP, Donaldson BA, Seaman S, Iyengar JR, Miles WF (1978) Recent studies in Canada on the analysis and occurrence of volatile and non-volatile N-nitroso compounds in foods. In: Walker EA, Gričute L, Castegnaro M, Lyle RE (eds) *Environmental Aspects of N-Nitroso Compounds*. International Agency for Research on Cancer, Lyon:373-393
- [56] Lutz WK (1999) Carcinogens in the diet vs. overnutrition. Individual dietary habits, malnutrition, and genetic susceptibility modify carcinogenic potency and cancer risk. *Mutat Res* 443:251-258
- [57] Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (1989) Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. In: Henschler D (ed) *Benzol*. Verlag Chemie, Weinheim:1-53
- [58] Léonard A, Gerber GB, Stecca C, Rueff J, Borba H, Farmer PB, Sram RJ, Czeizel AE, Kalina I (1999) Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of acrylonitrile. *Mutat Res* 436:263-283
- [59] Filser JG, Denk B, Törnqvist M, Kessler W, Ehrenberg L (1992) Pharmacokinetics of ethylene in man: body burden with ethylene oxide and hydroxyethylation of hemoglobin due to endogenous and environmental ethylene. *Arch Toxicol* 66:157-163
- [60] Törnqvist M, Gustafsson B, Kautiainen A, Harms-Ringdahl M, Granath F, Ehrenberg L (1989) Unsaturated lipids and intestinal bacteria as sources of endogenous production of ethene and ethylene oxide. *Carcinogenesis* 10:39-41
- [61] Lieberman M, Mapson LW (1964) Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature* 204:343-345
- [62] Kessler W, Remmer H (1990) Generation of volatile hydrocarbons from amino acids and proteins by an iron/ascorbate/GSH system. *Biochem Pharmacol* 39:1347-1351
- [63] Clemens MR, Einsele H, Frank H, Remmer H, Waller HD (1983) Volatile hydrocarbons from hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation of erythrocytes and their cell compounds. *Biochem Pharmacol* 32:3877-3878
- [64] Thier R, Bolt HM (2000) Carcinogenicity and genotoxicity of ethylene oxide: New aspects and recent advances. *Crit Rev Toxicol* 30:595-608

-
- [65] Esterbauer H, Eckl P, Ortner A (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* 238:223-233
- [66] Satoh K, Yamada S, Koike Y, Igarashi Y, Toyokuni S, Kumano T, Takahata T, Hayakari M, Tsuchida S, Uchida K (1999) A 1-hour enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of acrolein- and hydroxynonenal-modified proteins by epitope-bound casein matrix method. *Anal Biochem* 270:323-328
- [67] International Agency for Research on Cancer (1995) Acrolein. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. Vol. 63, pp. 337-372
- [68] Ridd JH (1961) Nitrosation, diazotisation and deamination. *Quarterly Review of the Chemical Society London* 15:418-425
- [69] Mirvish SS (1975) Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol* 31:325-351
- [70] Williams DHL (1983) Nitrosation mechanisms. *Advances in Physical Organic Chemistry* 19:381-428
- [71] Mende P, Spiegelhalder B, Wacker CD, Preussmann R (1989) Trapping of reactive intermediates from the nitrosation of primary amines by a new type of scavenger reagent. *Fd Chem Toxicol* 27:469-473
- [72] Röper H (1983) Chemie der Nitrosierung. In: Preussmann R (ed) *Das Nitrosamin Problem*. Verlag Chemie, Weinheim:189-212
- [73] Amin S, Desai D, Hecht SS, Hoffmann D (1996) Synthesis of tobacco-specific N-nitrosamines and their metabolites and results of related bioassays. *Crit Rev Toxicol* 26:139-147
- [74] Staretz ME, Murphy SE, Patten CJ, Nunes MG, Koehl W, Amin S, Koenig LA, Guengerich FP, Hecht SS (1996) Comparative metabolism of the tobacco-related carcinogens benzo[a]pyrene, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol, and N'-nitrosonornicotine in human hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 25:154-162
- [75] Hecht SS, Chen CB, Orna RM, Hoffmann D, Tso TC (1978) Chemical studies on tobacco smoke LVI. Tobacco specific nitrosamines: Origins, carcinogenicity and metabolism. *IARC Sci Publ* 19:395-413
- [76] Boyland E, Walker SA (1973) Effect of thiocyanate on nitrosation of amines. *Nature* 248:601-602
- [77] Fine TY, Tannenbaum SR (1973) Factors influencing the rate of formation of nitrosomorpholine from morpholine and nitrite: acceleration by thiocyanate and other anions. *J Agric Food Chem* 21:843-845
- [78] Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B (1988) Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat Res* 202:307-324

- [79] Licht WR, Fox JG, Deen WM (1988) Effects of ascorbic acid and thiocyanate on nitrosation of proline in the dog stomach. *Carcinogenesis* 9:373-377
- [80] Schmähl D (1981) Maligne Tumoren. Entstehung-Wachstum-Chemotherapie. Editio Cantor, Aulendorf:1-572
- [81] Tavares R, Borba H, Monteiro M, Proença MJ, Lynce N, Rueff J, Bailey E, Sweetman GMA, Lawrence RM, Farmer PB (1996) Monitoring of exposure to acrylonitrile by determination of *N*-(2-cyanoethyl)valine at the N-terminal position of haemoglobin. *Carcinogenesis* 17:2655-2660
- [82] Lewalter J (1996) N-alkylvaline levels in globin as a new type of biomarker in risk assessment of alkylating agents. *Int Arch Occup Environ Health* 68:519-530
- [83] Segerbäck D (1994) DNA Alkylation by ethylene oxide and some mono-substituted epoxides. In: Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerbäck D, Bartsch H (eds) *DNA Adducts: Identification and Biological Significance*, vol 125. International Agency for Research on Cancer, Lyon:37-47
- [84] Berhane K, Mannervik B (1990) Inactivation of the genotoxic aldehyde acrolein by human glutathione transferase of classes alpha, mu, and pi. *Mol Pharmacol* 37:251-254
- [85] Linhart I, Frantik E, Vodicková L, Vosmanská M, Smejkal J, Mitera J (1996) Biotransformation of acrolein in rat: Excretion of mercapturic acids after inhalation and intraperitoneal injection. *Toxicol Appl Pharmacol* 136:155-160
- [86] Ramu K, Perry CS, Ahmed T, Pakenham G, Kehrer JP (1996) Studies on the basis for the toxicity of acrolein mercapturates. *Toxicol Appl Pharmacol* 140:487-498
- [87] Hübner P, Groux PM, Weibel B, Sengstag C, Horlbeck J, Leong-Morgenthaler P-M, Lüthy J (1997) Genotoxicity of ethyl carbamate (urethane) in *Salmonella*, yeast and human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 390:11-19
- [88] Cai J, Myers SR, Hurst HE (1995) Measurement of the hemoglobin *N*-(2-oxoethyl)valine adduct in ethyl carbamate-treated mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 131:73-79
- [89] Fernando RC, Nair J, Barbin A, Miller JA, Bartsch H (1996) Detection of 1,*N*⁶-ethenodeoxyadenosine and 3,*N*⁴-ethenodeoxycytidine by immunoaffinity/³²P-post-labelling in liver and lung DNA of mice treated with ethyl carbamate (urethane) or its metabolites. *Carcinogenesis* 17:1711-1718
- [90] Degawa M, Stern SJ, Martin MV, Guengerich FP, Fu PP, Ilett KF, Kaderlik RK, Kadlubar FF (1994) Metabolic activation and carcinogen-DNA adduct detection in human larynx. *Cancer Res* 54:4915-4919
- [91] Boyland E, Nery R (1965) The metabolism of urethane and related compounds. *J Biochem* 94:198-208
- [92] Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996)

- P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42
- [93] Guengerich FP (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 4:391-407
- [94] Gonzalez FJ, Gelboin HV (1994) Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev* 26:165-183
- [95] Cashman JR, Park SB, Yang Z-C, Wrighton SA, Jacob III P, Benowitz NL (1992) Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of *trans*-nicotine *N'*-oxide. *Chem Res Toxicol* 5:639-646
- [96] Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K-I, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, Kuroiwa Y (1996) Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos* 24:1212-1217
- [97] Crespi CL, Penman BW, Leakey JAE, Arlotto MP, Stark A, Parkinson A, Turner T, Steimel DT, Rudo K, Davies RL, Langenbach R (1990) Human cytochrome P450IIA3: cDNA sequence, role of the enzyme in the metabolic activation of promutagens, comparison to nitrosamine activation by human cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis* 11:1293-1300
- [98] Yamazaki H, Inui Y, Yun C-H, Guengerich FP, Shimada T (1992) Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 13:1789-1794
- [99] Camus A-M, Geneste O, Honkakoski P, Béréziat J-C, Henderson CJ, Wolf CR, Bartsch H, Lang MA (1993) High variability of nitrosamine metabolism among individuals: Role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Mol Carcinog* 7:268-275
- [100] Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K (2000) Genetic polymorphism of *CYP* genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 9:3-28
- [101] Patten CJ, Smith TJ, Friesen MJ, Tynes RE, Yang CS, Murphy SE (1997) Evidence for cytochrome P450 2A6 and 3A4 as major catalysts for *N'*-nitrosonornicotine α -hydroxylation by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 18:1623-1630
- [102] Yu MC, Ross RK, Chan KK, Henderson BE, Skipper PL, Tannenbaum SR, Coetzee GA (1995) Glutathione S-transferase M1 genotype affects aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels in white, black, and Asian smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 4:861-864
- [103] van Poppel G, de Vogel N, van Balderen PJ, Kok FJ (1992) Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme μ . *Carcinogenesis* 13:303-305

- [104] Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300:271-276
- [105] Hallier E, Schröder KR, Asmuth K, Dommermuth A, Aust B, Goergens HW (1994) Metabolism of dichloromethane (methylene chloride) to formaldehyde in human erythrocytes: influence of polymorphism of glutathione transferase Theta (GST T1-1). *Arch Toxicol* 68:423-427
- [106] Schroeder M, Hallier E, Meyer DJ, Wiebel FA, Müller AMF, Bolt HM (1996) Purification and characterization of a new glutathione S-transferase, class theta, from human erythrocytes. *Arch Toxicol* 70:559-566
- [107] Peter H, Deutschmann S, Reichel C, Hallier E (1989) Metabolism of methyl chloride by human erythrocytes. *Arch Toxicol* 63:351-355
- [108] Hallier E, Langhof T, Dannappel D, Leutbecher M, Schröder K, Goergens HW, Müller A, Bolt HM (1993) Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence of the induction of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes. *Arch Toxicol* 67:173-178
- [109] Kempkes M, Wiebel FA, Golka K, Heitmann P, Bolt HM (1996) Comparative genotyping and phenotyping of glutathione S-transferase GSTT1. *Arch Toxicol* 70:306-309
- [110] La DK, Swenberg JA (1996) DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutat Res* 365:129-146
- [111] Shuker DEG, Farmer PB (1992) Relevance of urinary DNA adducts as markers of carcinogen exposure. *Chem Res Toxicol* 5:450-460
- [112] Lindahl T (1979) DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 22:135-192
- [113] Beranek DT (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231:11-30
- [114] Dipple A, Moschel RC, Hudgins WR (1982) Selectivity of alkylation and aralkylation of nucleic acid components. *Drug Metab Rev* 13:249-268
- [115] Kyrtopoulos SA, Anderson LM, Chhabra SK, Souliotis VL, Pletsa V, Valavanis C, Georgiadis P (1997) DNA adducts and the mechanism of carcinogenesis and cytotoxicity of methylating agents of environmental and clinical significance. *Cancer Detect Prev* 21:391-405
- [116] Neumann HG (2000) Protein-Addukte als biochemische Effekt-Marker für ein biologisches Monitoring. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 35:351-356
- [117] Törnqvist M (1989) Monitoring and cancer risk assessment of carcinogens, particularly alkenes in urban air. Doctor Thesis, University of Stockholm.

-
- [118] Fennell TR, MacNeella JP, Turner MJ, Swenberg JA (1991) Hemoglobin adduct formation by acrylonitrile in rats and mice. In: Garner RC, Farmer PB, Steel GT, Wright AS (eds) Human Carcinogen Exposure. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo:241-246
- [119] Calleman CJ (1982) In vivo dosimetry by means of alkylated hemoglobin - a tool in the design of tests for genotoxic effects. Banbury Report 13:157-168
- [120] Meyer VR (1997) Red blood cells and toxic chemicals. Analytical Chemistry News & Features June 1:340A
- [121] Törnqvist M, Landin HH (1995) Hemoglobin adducts for in vivo dose monitoring and cancer risk estimation. JOEM 37:1077-1085
- [122] Tannenbaum SR, Skipper PL, Wishnok JS, Stillwell WG, Day BW, Taghizadeh K (1993) Characterization of various classes of protein adducts. Environ Health Perspect 99:51-55
- [123] Tannenbaum SR, Bryant MS, Skipper PL, Maclure M (1986) Hemoglobin adducts of tobacco-related aromatic amines: application to molecular epidemiology. In: Hoffmann D, Harris CC (eds) Mechanisms in tobacco carcinogenesis, vol 23. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA:63-75
- [124] Skipper PL, Peng X, Soohoo CK, Tannenbaum SR (1994) Protein adducts as biomarkers of human carcinogen exposure. Drug Metab Rev 26:111-124
- [125] Bogovski P, Bogovski S (1981) Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer. Int J Cancer 27:471-474
- [126] Bartsch H, Malaveille C, Camus AM, Martel-Planche G, Brun G, Hautefeuille A, Sabadi N, Barbin A, Kukoki T, Devron G, Piccoli C, Montesano R (1980) Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. typhimurium* strains and V79 chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. Mutat Res 76:1-50
- [127] Umano K, Shibamoto T, Fernando SY, Wei C-I (1984) Mutagenicity of 2-hydroxyalkyl-N-nitrosothiazolidines. Fd Chem Toxicol 22:253-259
- [128] Ivankovic S (1975) Pränatale Carcinogenese. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, vol VI/7
- [129] Shuker DEG, Bartsch H (1994) DNA adducts of nitrosamines. In: Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerbäck D, Bartsch H (eds) DNA Adducts: Identification and Biological Significance. International Agency for Research on Cancer, Lyon:73-89
- [130] Montesano R, Magee PN (1970) Metabolism of dimethylnitrosamine by human liver slices in vitro. Nature 228:173-174
- [131] Wogan GN, Paglialunga S, Archer MC, Tannenbaum SR (1974) Carcinogenicity of nitrosation products of ephedrine, sarcosine, folic acid, and creatinine. Cancer Res 35:1981-1984

- [132] Preussmann R, Stewart BW (1984) *N*-nitroso carcinogens. In: Searle CE (ed) Chemical Carcinogens, vol 2. American Chemical Society, Washington, D.C.:643-828
- [133] Ohshima H, Bereziat J-C, Bartsch H (1982) Monitoring N-nitrosamino acids excreted in the urine and feces of rats as an index for endogenous nitrosation. *Carcinogenesis* 3:115-120
- [134] Adlkofer F, Scherer G, Heller W-D, Sünkeler X, Heintz T (1990) The significance of urinary hydroxyproline excretion in smokers and passive smokers. In: Kasuga H (ed) Indoor Air Quality. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg:213-218
- [135] Hecht SS (1996) Recent studies on mechanisms of bioactivation and detoxification of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific lung carcinogen. *Crit Rev Toxicol* 26:163-181
- [136] Hecht SS, Hoffmann D (1988) Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 9:875-884
- [137] Hecht SS, Hoffmann D (1989) The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv* 8:273-294
- [138] Loeppky RN, Michejda CJ (1994) Nitrosamines and Related *N*-Nitroso Compounds. Chemistry and Biochemistry. ACS Symposium Series 553. Developed from a symposium sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry at the 204th National Meeting of the American Chemical Society, Washington, D.C., August 23-28, 1992
- [139] Richter E (1996) Haemoglobin adducts of *N*-nitroso compounds. *European Journal of Cancer Prevention* 5 (Suppl.1):115-119
- [140] Witschi H, Espiritu I, Maronpot RR, Pinkerton KE, Jones AD (1997) The carcinogenic potential of the gas phase of environmental tobacco smoke. *Carcinogenesis* 18:2035-2042
- [141] Meger M, Richter E, Zwickelpflug W, Oehlmann C, Hargaden MB, A-Rahim YIA, Vesell ES (1999) Metabolism and disposition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in Rhesus monkeys. *Drug Metab Dispos* 27:471-478
- [142] Deutsche Forschungsgemeinschaft (1998) MAK- und BAT-Werte-Liste 1998. Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Vol. Mitteilung 34. Wiley-VCH, Weinheim:1-201
- [143] Preston RJ (1999) Cytogenetic effects of ethylene oxide, with an emphasis on population monitoring. *Crit Rev Toxicol* 29:263-282
- [144] Lewalter J, Neumann H-G (1996) Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte (Biomonitoring). Teil VIII: Bewertung der Hintergrundbelastungen bei beruflich nicht-exponierten Personen. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 31:418-432

-
- [145] Lewalter J, Neumann H-G (1998) Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte (Biomonitoring). Teil XIII: Die Bedeutung von Referenzwerten für die Bewertung von Fremdstoffbelastungen. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 33:388-393
- [146] International Agency for Research on Cancer (1985) Acrolein. IARC Monographs. Vol. 36, pp. 133-161
- [147] Horton ND, Mamiya BM, Kehrer JP (1997) Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein. *Toxicolgy* 122:111-122
- [148] Seutter-Berlage F, van Dorp HL, Kosse HGJ, Henderson PT (1977) Urinary mercapturic acid excretion as a biological parameter of exposure to alkylating agents. *Int Arch Occup Environ Health* 39:45-51
- [149] Van Welie RTH, Van Marrewijk CM, De Wolff FA, Vermeulen NPE (1991) Thioether excretion in urine of applicators exposed to 1,3 dichloropropene: a comparison with urinary mercapturic acid excretion. *Br J Ind Med* 48:492-497
- [150] Van Doorn R, Leijdekker C-M, Bos RP, Brouns RME, Henderson PT (1981) Enhanced excretion of thioethers in urine of operators of chemical waste incinerators. *Br J Ind Med* 38:187-192
- [151] Vainio H, Savolainen H, Kilpikari I (1978) Urinary thioether of employees of a chemical plant. *Br J Ind Med* 35:232-236
- [152] Kilpikari I (1981) Correlation of urinary thioether with chemical exposure in a rubber plant. *Br J Ind Med* 38:98-104
- [153] Van Doorn R, Leijdekkers C-M, Henderson PT, Vanhoorne M, Vertin PG (1981) Determination of thio compounds in urine of workers exposed to carbon disulfide. *Arch Environ Health* 36:289-293
- [154] Kilpikari I, Savolainen H (1982) Increased urinary excretion of thioether in new rubber workers. *Br J Ind Med* 39:401-405
- [155] Scherer G, Doolittle DJ, Ruppert T, Meger-Kossien I, Riedel K, Tricker AR, Adlkofer F (1996) Urinary mutagenicity and thioethers in nonsmokers: Role of environmental tobacco smoke (ETS) and diet. *Mutat Res* 368:195-204
- [156] Malonova H, Bardodej Z (1983) Urinary excretion of mercapturates as a biological indicator of exposure to electrophilic agents. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 27:319-328
- [157] van Welie RTH, van Dijck RGJM, Vermeulen NPE (1992) Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 22:271-306
- [158] Norström A, Andersson B, Levin J-O (1986) A procedure for the analysis of S-benzyl-N-acetylcysteine and S-(o-methylbenzyl)-N-acetylcysteine in human urine. *Xenobiotica* 16:525-529

- [159] van Sittert NJ (1984) Biomonitoring of chemicals and their metabolites. In: Berlin A, Draper M, Hemminki K, Vainio H (eds) *Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic Agents*, vol 59. International Agency for Research on Cancer, Lyon:153-172
- [160] Jongeneelen FJ, Dirven HAAM, Leijdekkers C-M, Henderson PT (1987) S-phenyl-N-acetylcysteine in urine of rats and workers after exposure to benzene. *J Anal Toxicol* 11:100-104
- [161] Ogata M, Taguchi T (1987) Quantitation of urinary metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene, benzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. *Int Arch Occup Environ Health* 59:263-272
- [162] Truchon G, Brodeur J, Gerin M (1990) Simultaneous determination of urinary mandelic, phenylglyoxylic, and mercapturic acids of styrene by high-performance liquid chromatography (abstract). *J Anal Toxicol* 14:227-230
- [163] Truchon G, Gérin M, Brodeur J (1990) Urinary excretion of mandelic, phenylglyoxylic, and specific mercapturic acids in rats exposed repeatedly by inhalation to various concentrations of styrene vapors. *Can J Physiol Pharmacol* 68:556-561
- [164] Toyo'oka T, Suzuki T, Saito Y, Takahashi A (1989) Electrochemical detection of mercapturic acid derivatives after separation by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 475:391-399
- [165] Sanduja R, Ansari GA, Boor PJ (1989) 3-Hydroxypropylmercapturic acid: a biologic marker of exposure to allylic and related compounds. *J Appl Toxicol* 9:235-238
- [166] Eskinja M, Lamprecht G, Scherer G, Schmid ER (1997) Assay of S-ethyl-N-acetyl-L-cysteine in urine by high-performance liquid chromatography using post-column reaction detection. *J Chromatogr* 704:159-165
- [167] Popp W, Vahrenholz C, Przygoda H, Brauksiepe A, Goch S, Müller G, Schell C, Norpoth K (1994) DNA-protein cross-links and sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes and hydroxyethyl mercapturic acid in urine of ethylene oxide-exposed hospital workers. *Int Arch Occup Environ Health* 66:325-332
- [168] Gérin M, Tardif R, Brodeur J (1988) Determination of specific urinary thioethers derived from acrylonitrile and ethylene oxide. In: Bartsch H, Hemminki K, O'Neill IK (eds) *Methods for Detecting DNA Damaging Agents in Humans: Application in Cancer Epidemiology and Prevention*, vol 89. International Agency for Research on Cancer, Lyon:275-278
- [169] Onkenhout W, Guijt GJ, de Jong HJ, Vermeulen NPE (1982) Capillary gas chromatographic analysis of mercapturic acids. Decomposition of mercapturic acids according to a "retro-Michael" reaction. *J Chromatogr* 243:362-367
- [170] Vermeulen NPE, Onkenhout W, van Bladeren PJ (1983) The analysis of mercapturic acids in biological fluids; applications of gas-liquid chromatography and (EI- and CI-) mass spectrometry. In: Frigerio A (ed) *Chromatography and mass spectrometry in biomedical sciences*, vol 2. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam:39-53

-
- [171] Onkenhout W, Mulder PPJ, Boogaard PJ, Buijs W, Vermeulen NPE (1986) Identification and quantitative determination of mercapturic acids formed from Z- and E-1,3-dichloropropene by the rat, using gas chromatography with three different detection techniques. *Arch Toxicol* 59:235-241
- [172] Jakubowski M, Linhart I, Pielas G, Kopecký J (1987) 2-Cyanoethylmercaptopuric acid (CEMA) in the urine as a possible indicator of exposure to acrylonitrile. *Br J Ind Med* 44:834-840
- [173] Mascher DG, Mascher HJ, Scherer G, Schmid ER (2001) High-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of 3-hydroxypropyl-mercaptopuric acid in human urine. *J Chromatogr B* 750:163-169
- [174] Driskell WJ, Hill jr. RH, Shealy DB, Hull RD, Hines CJ (1996) Identification of a major human urinary metabolite of alachlor by LC-MS/MS. *Bull Environ Contam Toxicol* 56:853-859
- [175] Driskell WJ, Hill jr. RH (1997) Identification of a major human urinary metabolite of metalachlor by LC-MS/MS. *Bull Environ Contam Toxicol* 58:929-933
- [176] Moriwaki H, Tsujimoto Y, Noda T, Shimizu M, Tanaka M (2000) Determination of mercapturic acids in urine by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 125:715-718
- [177] Stanek W, Hayek EWH, Krenmayr P, Schmid ER (1999) Tandem mass spectrometric studies of mercapturic acid derivatives. Fragmentation, structure elucidation of fragment ions and development of an analytical method. *Fresenius J Anal Chem* 340:201-206
- [178] Potter D, Blair D, Davies R, Watson WP, Wright AS (1989) The relationships between alkylation of haemoglobin and DNA in Fischer 344 rats exposed to [¹⁴C]ethylene oxide. *Arch Toxicol Suppl* 13:254-257
- [179] Ríos-Blanco MN, Faller TH, Nakamura J, Kessler W, Kreuzer PE, Ranasinghe A, Filser JG, Swenberg JA (2000) Quantitation of DNA and hemoglobin adducts at apurinic/apyrimidinic sites in tissues of F344 rats exposed to propylene oxide by inhalation. *Carcinogenesis* 21:2011-2018
- [180] Greim H (1999) Die Bedeutung der Genotoxizität in der Arbeitsmedizin. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 34:2-5
- [181] Müller M, Krämer A, Angerer J, Hallier E (1998) Ethylene oxide-protein adduct formation in humans: influence of glutathione-S-transferase polymorphisms. *Int Arch Occup Environ Health* 71:499-502
- [182] Bergmark E (1997) Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers, and nonsmokers. *Chem Res Toxicol* 10:78-84
- [183] Austin H, Delzell E, Cole P (1988) Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Am J Epidemiol* 127:419-439

- [184] Kautiainen A, Törnqvist M, Svensson K, Osterman-Golkar S (1989) Adducts of malonaldehyde and a few other aldehydes to hemoglobin. *Carcinogenesis* 10:2123-2130
- [185] Fennell TR, MacNeela JP, Morris RW, Watson M, Thompson CL, Bell DA (2000) Hemoglobin adducts from acrylonitrile and ethylene oxide in cigarette smokers: Effects of *glutathione S-transferase T1*-null and *M1*-null genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 9:705-712
- [186] Johnson G, Ernstgård L, Gullstrand E, Löf A, Osterman-Golkar S, Williams CC, Sumner SCJ (2000) Styrene oxide in blood, hemoglobin adducts, and urinary metabolites in human volunteers exposed to ¹³C₈-styrene vapors. *Toxicol Appl Pharmacol* 168:36-49
- [187] Kautiainen A, Törnqvist M (1991) Monitoring exposure to simple epoxides and alkenes through gas chromatographic determination of hemoglobin adducts. *Int Arch Occup Environ Health* 63:27-31
- [188] Van Sittert NJ, Beulink GDJ, van Vliet EWN, van der Waal H (1993) Monitoring occupational exposure to ethylene oxide by the determination of hemoglobin adducts. *Environ Health Perspect* 99:217-220
- [189] Osterman-Golkar S (1999) Methods for biological monitoring of propylene oxide exposure in Fischer 344 rats. *Toxicology* 134:1-8
- [190] Boogaard PJ, Rocchi PSJ, van Sittert NJ (1999) Biomonitoring of exposure to ethylene oxide and propylene oxide by determination of hemoglobin adducts: correlations between airborne exposure and adduct levels. *Int Arch Occup Environ Health* 72:142-150
- [191] Pauwels W, Veulemans H (1998) Comparison of ethylene, propylene and styrene 7,8-oxide in vitro adduct formation on N-terminal valine in human haemoglobin and on N-7-guanine in human DNA. *Mutat Res* 418:21-33
- [192] Svensson K, Osterman-Golkar S (1987) In vivo 2-oxoethyl adducts in hemoglobin and their possible origin. In: Sandhu SS, DeMarini DM, Mass MJ, Moore MM, Mumford JL (eds) *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures V*. Plenum Press, New York, London:49-65
- [193] Bergmark E, Calleman CJH F, Costa LG (1993) Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 120:45-54
- [194] Landin HH, Osterman-Golkar S, Zorcec V, Törnqvist M (1996) Biomonitoring of epichlorohydrin by hemoglobin adducts. *Anal Biochem* 240:1-6
- [195] Farmer PB, Cordero R, Autrup H (1996) Monitoring human exposure to 2-hydroxyethylating carcinogens. *Environ Health Perspect* 104:449-452
- [196] Bader M, Lewalter J, Angerer J (1995) Analysis of N-alkylated amino acids in human hemoglobin: evidence for elevated N-methylvaline levels in smokers. *Int Arch Occup Environ Health* 67:237-242

-
- [197] Osterman-Golkar SM, MacNeela JP, Turner MJ, Walker VE, Swenberg JA, Sumner SJ, Youtsey N, Fennell TR (1994) Monitoring exposure to acrylonitrile using adducts with *N*-terminal valine in hemoglobin. *Carcinogenesis* 15:2701-2707
- [198] Tavares R, Ramos P, Palminha J, Bispo MA, Paz I, Bras A, Rueff J, Farmer PB, Bailey E (1994) Transplacental exposure to genotoxins. Evaluation in haemoglobin of hydroxyethylvaline adduct levels in smoking and non-smoking mothers and their newborns. *Carcinogenesis* 15:1271-1274
- [199] Törnqvist M, Svartengren M, Ericsson CH (1992) Methylations in hemoglobin from monozygotic twins discordant for cigarette smoking: Hereditary and tobacco-related factors. *Chem Biol Interactions* 82:91-98
- [200] Walker VE, MacNeela JP, Swenberg JA, Turner MJ, Fennell TR (1992) Molecular dosimetry of ethylene oxide: Formation and persistence of N-(2-Hydroxyethyl)valine in hemoglobin following repeated exposures of rats and mice. *Cancer Res* 52:4320-4327
- [201] Mowrer J, Törnqvist M, Jensen S, Ehrenberg L (1986) Modified Edman degradation applied to hemoglobin for monitoring occupational exposure to alkylating agents. *Toxicological and Environmental Chemistry* 11:215-231
- [202] Bailey E, Brooks AGF, Dollery CT, Farmer PB, Passingham BJ, Sleightholm MA, Yates DW (1988) Hydroxyethylvaline adduct formation in haemoglobin as a biological monitor of cigarette smoke intake. *Arch Toxicol* 62:247-253
- [203] Törnqvist M, Mowrer J, Jensen S, Ehrenberg L (1986) Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method. *Anal Biochem* 154:255-266
- [204] Carmella SG, Kagan SS, Kagan M, Foiles PG, Palladino G, Quart AM, Quart E, Hecht SS (1990) Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine hemoglobin adducts in snuff dippers, smokers, and nonsmokers. *Cancer Res* 50:5438-5445
- [205] Coghlin J, Gann PH, Hammond SK, Skipper PL, Taghizadeh K, Paul M, Tannenbaum SR (1991) 4-aminobiphenyl hemoglobin adducts in fetuses exposed to the tobacco smoke carcinogen in utero. *J Natl Cancer Inst* 83:274-280
- [206] Birner G, Albrecht W, Neumann HG (1990) Biomonitoring of aromatic amines. III: Hemoglobin binding of benzidine and some benzidine congeners. *Arch Toxicol* 64:97-102
- [207] Perera FP, Santella RM, Brenner D, Poirier MC, Mushi AA (1987) DNA-adducts, protein adducts, and sister chromatid exchange in cigarette smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 79:449-456
- [208] Stillwell WG, Bryant MSD, Wishnok JS (1987) GC/MS analysis of biologically important aromatic amines. Application to human dosimetry. *Biomed Environ Mass Spectrom* 14:221-227

- [209] Bailey E, Brooks AG, Bird I, Farmer PB, Street B (1990) Monitoring Exposure to 4,4'-methylenedianiline by the gas chromatography-mass spectrometry determination of adducts to hemoglobin. *Anal Biochem* 190:175-181
- [210] Ehrenberg L, Osterman-Golkar S, Segerbäck D, Svensson K, Calleman CJ (1977) Evaluation of genetic risks of alkylating agents. III. Alkylation of haemoglobin after metabolic conversion of ethene to ethene oxide in vivo. *Mutat Res* 45:175-184
- [211] Osterman-Golkar S, Bergmark E (1988) Alkylation of haemoglobin, plasma proteins and DNA in the mouse by diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 9:1915-1917
- [212] Shugart L (1985) Quantitating exposure to chemical carcinogens: in vivo alkylation of hemoglobin by benzo[a]pyrene. *Toxicology* 34:211-220
- [213] Richter E, Kutzer C, Falter B (1993) Simultaneous determination of hemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. MESAEP-Symposium 1993
- [214] Falter B, Kutzer C, Richter E (1994) Biomonitoring of hemoglobin adducts: aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin Investig* 72:364-371
- [215] Sepai O, Henschler D, Sabbioni G (1995) Albumin adducts, hemoglobin adducts and urinary metabolites in workers exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Carcinogenesis* 16:2583-2587
- [216] Kutzer C, Branner B, Zwickenspflug W, Richter E (1997) Simultaneous solid-phase extraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of hemoglobin adducts from tobacco-specific nitrosamines and aromatic amines. *J Chromatogr Sci* 35:1-6
- [217] Ivanov V, Hashimoto K, Inomata K, Kawai T, Mizunuma K, Klimatskaya L (1993) Biological monitoring of acrylonitrile exposure through a new analytical approach to hemoglobin and plasma protein adducts and urinary metabolites in rats and humans. *Int Arch Occup Environ Health* 65:5103-5106
- [218] Autrup H, Grafström R, Vahakangas K, Harris CC (1986) Inter-individual variations in carcinogen metabolism. *Arch Toxicol Suppl.* 9:147-153
- [219] Otteneeder M, Lutz WK (1999) Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. *Mutat Res* 424:237-247
- [220] Lutz WK (2000) DNA-Addukte als Genotoxizitätsmarker für ein biologisches Monitoring. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 35:303-311
- [221] Garner RC (1998) The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutat Res* 402:67-75
- [222] Perera FP (1988) The significance of DNA and protein adducts in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 205:255-269

-
- [223] Farmer PB (1999) Studies using specific biomarkers for human exposure assessment to exogenous and endogenous chemical agents. *Mutat Res* 428:69-81
- [224] Nestmann ER, Bryant DW, Carr CJ, Fennell TT, Gallagher JE, Gorelick NJ, Swenberg JA, Williams GM (1996) Toxicological significance of DNA adducts: Summary of discussions with an expert panel. *Regulatory Toxicol Pharmacol* 24:9-18
- [225] Farmer PB, Shuker DEG, Bird I (1986) DNA and protein adducts as indicators of in vivo methylation by nitrosatable drugs. *Carcinogenesis* 7:49-52
- [226] Shuker DEG, Bailey E, Parry A, Lamb J, Farmer PB (1987) The determination of urinary 3-methyladenine in humans as a potential monitor of exposure to methylating agents. *Carcinogenesis* 8:959-962
- [227] Karran P, Lindahl T (1985) Cellular defence mechanisms against alkylating agents. *Cancer Surv* 4:583-599
- [228] Den Engelse L, Menkveld GJ, De Brij R-J, Tates AD (1986) Formation and stability of alkylated pyrimidines and purines (including imidazole ring-opened 7-alkylguanine) and alkylphosphotriesters in liver DNA of adult rats treated with ethylnitrosourea or dimethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 7:393-403
- [229] Helland DE, Male R, Haukanes BI, Olsen L, Haugan I, Kleppe K (1987) Properties and mechanism of action of eukaryotic 3-methyladenine-DNA glycosylases. *J Cell Sci Suppl* 6:139-146
- [230] Prévost V, Shuker DEG, Friesen MD, Eberle G, Rajewsky MF, Bartsch H (1993) Immunoaffinity purification and gas chromatography-mass spectrometric quantification of 3-alkyladenines in urine: metabolism studies and basal excretion levels in man. *Carcinogenesis* 14:199-204
- [231] Friesen MD, Garren L, Prévost V, Shuker DEG (1991) Isolation of urinary 3-methyladenine using immunoaffinity columns prior to determination by low-resolution gas chromatography-mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 4:102-106
- [232] Eberle G (1989) Monoklonale Antikörper gegen Kanzerogen-DNS Addukte. Dr. rer. nat. Thesis, Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Universität Essen, Germany:1-191
- [233] Board PG (1981) Gene deletion and partial deficiency of the glutathione *S*-transferase (ligandin) system in man. *FEBS Let* 135:12-14
- [234] Yang M, Kunugita N, Kitagawa K, Kang S-H, Coles B, Kadlubar FF, Katoh T, Matsuno K, Kawamoto T (2001) Individual differences in urinary cotinine levels in Japanese Smokers: Relation to genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 10:589-593
- [235] Bartsch H (1996) DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutat Res* 340:67-79

- [236] Prévost V, Shuker DEG, Bartsch H, Pastorelli R, Stillwell WG, Trudel LJ, Tannenbaum SR (1990) The determination of urinary 3-methyladenine by immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA: use in human biomonitoring studies. *Carcinogenesis* 11:1747-1751
- [237] Helger R, Rindfrey H, Hilgenfeldt J (1974) A method for the direct determination of creatinine in serum and urine without deproteinization using a modified Jaffé method. *Z Klin Chem Klin Biochem* 12:344-349
- [238] Ullmann R, Bonitz K (1976) Vollmechanisierte kinetische Messung von Kreatinin. *Med Lab Sci* 29:137-145
- [239] Feyerabend C, Levitt T, Russell MAH (1975) A rapid gas-liquid chromatographic estimation of nicotine in biological fluids. *J Pharm Pharmacol* 27:434-436
- [240] Ogden MW, Maiolo KC (1992) Comparative evaluation of diffusive and active sampling systems for determining airborne nicotine and 3-ethenylpyridine. *Environ Sci Technol* 26:1226-1234
- [241] Aringer L, Lidums V (1988) Influence of diet and other factors on urinary levels of thioethers. *Int Arch Occup Environ Health* 61:123-130
- [242] Kromidas S (2000) *Handbuch Validierung in der Analytik*. Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto:1-503
- [243] Bernert jr. JT, McGuffey JE, Morrison MA, Pirkle JL (2000) Comparison of serum and salivary cotinine measurements by a sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method as an indicator of exposure to tobacco smoke among smokers and nonsmokers. *J Anal Toxicol* 24:333-339
- [244] Etter J-F, Duc TV, Perneger TV (2000) Saliva cotinine levels in smokers and nonsmokers. *Am J Epidemiol* 151:251-258
- [245] Wall MA, Johnson J, Jacob P, Benowitz NL (1988) Cotinine in the serum, saliva, and urine of nonsmokers, passive smokers, and active smokers. *Am J Publ Health* 78:699-701
- [246] Jarczyk L, Scherer G, Adlkofer F (1989) Serum and saliva concentrations of cotinine in smokers and passive smokers. *J Clin Chem Clin Biochem* 27:230-231
- [247] Etzel RA (1990) A review of the use of Saliva cotinine as a marker of tobacco smoke exposure. *Prev Med* 19:190-197
- [248] Murray DM, McBride C, Lindquist R, Belcher JD (1991) Sensitivity and specificity of saliva thiocyanate and cotinine for cigarette smoking: A comparison of two collection methods. *Addict Behav* 16:161-166
- [249] Bentley MC, Abrar M, Kelk M, Cook M, Cook J, Phillips K (1999) Validation of an assay for the determination of cotinine and 3-hydroxycotinine in human saliva using automated solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B* 723:185-194

-
- [250] Benowitz NL (1983) The use of biologic fluid samples in assessing tobacco smoke consumption. In: Grabowski J, Bell CS (eds) Measurement in the Analysis and treatment of Smoking Behavior, vol 48. National Institute on Drug Abuse, Rockville:6-26
- [251] Meger M, Meger-Kossien I, Schuler-Metz A, Janket D, Scherer G (2001) Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid chromatography tandem mass spectrometric (LC-MSMS) detection. J Chromatogr B, im Druck
- [252] Degiampietro P, Peheim E, Drew D, Graf H, Colombo JP (1987) Determination of thiocyanate in plasma and saliva without deproteinization and its validation as a smoking parameter. J Clin Chem Clin Biochem 25:711-717
- [253] Krause G, Garganta F, Kosytorz P, Scherer G (1998) Genotyping metabolic polymorphisms in a cohort of Caucasians and SSCP-analysis of point mutations in human *hprt* exons 7 and 8. Electrophoresis 19:2380-2388
- [254] Krause G, Scherer G (2001) Glutathion-S-Transferase-Gene M1 und T1 (*GSTM1*, *GSTT1*). In: Greim H (ed) Analysen in biologischem Material. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- [255] Abdel-Rahman SZ, Randa AE-Z, Wagida AA, Au WW (1996) A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. Cancer Lett 107:229-233
- [256] Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GCW, Wolf CR (1997) Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. Carcinogenesis 18:641-644
- [257] Watson MA, Stewart RK, Smith GBJ, Massey TE, Bell DA (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. Carcinogenesis 19:275-280
- [258] Csanády GA, Denk B, Pütz C, Kreuzer PEK W, Baur C, Gargas M, Filser JG (2000) A physiological toxicokinetic model for exogenous and endogenous ethylene and ethylene oxide in rat, mouse, and human: Formation of 2-hydroxyethyl adducts with hemoglobin and DNA. Toxicol Appl Pharmacol 165:1-26
- [259] van Sittert J, van Vliet EWN (1994) Monitoring occupational exposure to some industrial chemicals by determining hemoglobin adducts. Clin Chem 40:1472-1475
- [260] Lawrence RM, Sweetman GMA, Tavares R, Farmer PB (1996) Synthesis and characterization of peptide adducts for use in monitoring human exposure to acrylonitrile and ethylene oxide. Teratogenesis Carcinog Mutagen 16:139-148
- [261] Törnqvist M, Magnusson A-L, Farmer PB, Tang Y-S, Jeffrey AM, Wazneh L, Beulink GDT, Van der Waal H, Van Sittert NJ (1992) Ring test for low levels of *N*-(2-hydroxyethyl)valine in human hemoglobin. Anal Biochem 203:357-360

- [262] Törnqvist M (1990) Formation of reactive species that lead to hemoglobin adducts during storage of blood samples. *Carcinogenesis* 11:51-54
- [263] Huber L (1998) Validation of analytical methods: Review and strategy. *LC-GC Intl* February 1998:96-105
- [264] Schultz WB (1995) Department of health and human services. Food and Drug Administration. International Conference on Harmonisation; Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability; Notice. Federalregister, March 1, 1995
- [265] Kromidas S (1998) Zum Umfang der Validierung in der Analytik. *Nachr Chem Tech Lab* 46:S28-S32
- [266] Buick AR, Doig MV, Jeal SC, Land GS, McDowall RD (1990) Method validation in the bioanalytical laboratory. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* 8:629-637
- [267] Meyer VM (1996) Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern. Verlag Hüthig, Heidelberg
- [268] Karnes HT, Shiu G, Shah VP (1991) Validation of bioanalytical methods. *Pharm Res* 8:421-426
- [269] McLafferty FW, Turecek F (1993) Interpretation von Massenspektren. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford:1-380
- [270] Chen M, Carmella SG, Villalta P, Hecht SS (2001) Ethylation of N-terminal valine of haemoglobin in smokers and nonsmokers. Poster, University of Minnesota Cancer Center, Minneapolis, MN 55455, 2001
- [271] Bono R, Vincenti M, Meineri V, Pignata C, Saglia U, Giachino O, Scursatone E (1999) Formation of *N*-(2-hydroxyethyl)valine due to exposure to ethylene oxide via tobacco smoke: a risk factor for onset of cancer. *Environmental Research Section* 81:62-71
- [272] Törnqvist M, Osterman-Golkar S, Kautiainen A, Jensen S, Farmer PB, Ehrenberg L (1986) Tissue doses of ethylene oxide in cigarette smokers determined from adduct levels in hemoglobin. *Carcinogenesis* 7(9):1519-1521
- [273] Tates AD, Grummt T, Törnqvist M, Farmer PB, van Dam FJ, van Mossel H, Schoemaker HM, Osterman-Golkar S, Uelbel C, Tang YS, Zwinderman AH, Natarajan AT, Ehrenberg L (1991) Biological and chemical monitoring of occupational exposure to ethylene oxide. *Mutat Res* 250:483-497
- [274] Thier R, Lewalter J, Kempkes M, Selinski S, Brüning T, Bolt HM (1999) Haemoglobin adducts of acrylonitrile and ethylene oxide in acrylonitrile workers, dependent on polymorphisms of the glutathione transferase GSTT1 and GSTM1. *Arch Toxicol* 73:197-202
- [275] Niessen WMA, Tinke AP (1995) Liquid chromatography-mass spectrometry: general principles and instrumentation. *J Chromatogr* 703:37-57

-
- [276] Niessen WMA (1999) State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 856:179-197
- [277] Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB (1968) Molecular beams of macroions. 49:2240-2249
- [278] Clegg GA, Dole M (1971) Molecular beams of macroions. III. Zein and polyvinylpyrrolidone. *Biopolymers* 10:821-826
- [279] Yamashita M, Fenn J (1984) . *JPhysChem* 88:4451-4454
- [280] Aleksandrov ML, Gall LN, Krasnov VN, Nikolaev VI, Pavlenko VA, Shkurov VA (1984) . *Dokl Akad Nauk SSSR* 277:379-387
- [281] Aleksandrov ML, Gall LN, Krasnov VN, Nikolaev VI, Pavlenko VA, Shkurov VA, Baram GI, Gracher GA, Knorre VD, Kisner YS (1984) . *Bioorg Khim* 10:710-712
- [282] Smith RD, Light-Wahl KJ (1993) The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: promise, perspectives, pitfalls. *Biological Mass Spectrometry* 22:493-501
- [283] Loo JA, Edmonds CG, Udseth HR, Smith RD (1990) Effect of reducing disulfide-containing proteins on electrospray ionization mass spectra. *Anal Chem* 62:693-698
- [284] Chowdhury SK, Katta V, Chait BT (1990) Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* 112:9012-9013
- [285] Schmelzeisen-Redeker G, Butfering L, Röllgen FW (1989) Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 90:139-150
- [286] Thomson BA, Iribarne IV (1979) . *J Chem Phys* 71:4451-4454
- [287] Fenn JB (1993) . *J Am Soc Mass Spectrom* 4:524-527
- [288] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1990) Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews* 9:37-70
- [289] Choi BK, Hercules DM, Gusev AI (2001) LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius J Anal Chem* 369:370-377
- [290] Pittenauer E, Zollinger M, Schmid ER, Allmaier G (1993) Comparison of plasma desorption- and thermospray-mass spectra of mercapturic acids. *Proceedings 41st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. May 31 - June 4, 1993. San Francisco, California
- [291] Eskinja M, Zöllner P, Linnemayr K, Mak M, Schmidt ER (1997) Characterization of mercapturic acids by three different mass spectrometric methods. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11:931-935

- [292] Stanek W, Krenmayr P, Scherer G, Schmid ER (1993) Quantitative determination of N-acetyl(-L-)cysteine derivatives in human urine by tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* 22:133-142
- [293] Tsikas D, Brunner G (1992) High-performance liquid chromatography of glutathione conjugates. I. Ion-pair reversed-phase chromatography and UV detection. *Fresenius J Anal Chem* 343:326-329
- [294] Tsikas D, Brunner G (1992) High-performance liquid chromatography of glutathione conjugates. II. Ion-exchange chromatography and fluorescence detection. *Fresenius J Anal Chem* 343:330-334
- [295] Kim D-H, Guengerich FP (1989) Excretion of the mercapturic acid S-[2-(N⁷-Guanyl)ethyl]-N-acetylcysteine in urine following administration of ethylene dibromide to rats. *Cancer Res* 49:5843-5847
- [296] Ziegler SJ, Sticher O (1988) Electrochemical, fluorescence, and UV detection for HPLC analysis of various cysteine derivatives. *Journal of HRC & CC* 11:639-646
- [297] Bean MF, Pallante-Morell SL, Dulik DM, Fenselau C (1990) Protocol for liquid chromatography/mass spectrometry of glutathione conjugates using postcolumn solvent modification. *Anal Chem* 62:121-124
- [298] Milikian AA, O'Connor R, Prahalad AK, Hu P, Li H, Kagan M, Thompson S (1999) Determination of the urinary benzene metabolites *S*-phenylmercapturic acid and *trans*, *trans*-muconic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis* 20:719-726
- [299] Vermeulen NPE (1989) Analysis of mercapturic acids as a tool in biotransformation, biomonitoring and toxicological studies. *TiPS* 10:1-177
- [300] Beranek DT, Weis CC, Swenson DH (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis* 1:595-606
- [301] Zhao C, Tyndyk M, Eide I, Hemminki K (1999) Endogenous and background DNA adducts by methylating and 2-hydroxyethylating agents. *Mutat Res* 424:117-125
- [302] Van Delft JHM, van Weert EJM, van Winden MJM, Baan RA (1991) Determination of N⁷-(2-hydroxyethyl)guanine by HPLC with electrochemical detection. *Chem Biol Interactions* 80:281-289
- [303] Kopplin A, Eberle-Adamkiewicz G, Glösenkamp K-H, Nehls P, Kirstein U (1995) Urinary excretion of 3-methyladenine and 3-ethyladenine after controlled exposure to tobacco smoke. *Carcinogenesis* 16:2637-2641
- [304] Prevost V, Shuker DEG (1996) Cigarette smoking and urinary 3-alkyladenine excretion in man. *Chem Res Toxicol* 9:439-444

-
- [305] Eberle G, Neuhaus A, Glüsenkamp K-H, Kirstein U, Nehls P, Rajewsky MF, Scherer G, Daube H, Tricker AR, Adlkofer FX (1994) Urinary excretion of 3-methyladenine and 3-ethyladenine after controlled exposure to tobacco smoke.
- [306] Farmer PB, Sweetman GMA (1995) Mass spectrometric detection of carcinogen adducts. *J Mass Spectrom* 30:1369-1379
- [307] Shuker DEG, Prevost V, Friesen MD, Lin D, Ohshima H, Bartsch H (1993) Urinary markers for measuring exposure to endogenous and exogenous alkylating agents and precursors. *Environ Health Perspect* 99:33-37
- [308] Apruzzese WA, Vouros P (1998) Analysis of DNA adducts by capillary methods coupled to mass spectrometry: a perspective. *J Chromatogr* 794:97-108
- [309] Singh R, Sweetman GMA, Farmer PB, Shuker DEG, Rich KJ (1997) Detection and characterization of two major ethylated deoxyguanosine adducts by high performance liquid chromatography, electrospray mass spectrometry, and ^{32}P -postlabeling, development of an approach for detection of phosphotriesters. *Chem Res Toxicol* 10:70-77
- [310] Andrews CL, Vouros P, Harsch A (1999) Analysis of DNA adducts using high-performance separation techniques coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 856:515-526
- [311] Yen T-Y, Christova-Gueoguieva NI, Scheller N, Holt S, Swenberg JA, Charles MJ (1996) Quantitative analysis of the DNA adduct $N^2,3$ -ethenoguanine using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 31:1271-1276
- [312] Chaudhary AK, Nokubo M, Oglesby TD, Marnett LJ, Blair IA (1995) Characterization of endogenous DNA adducts by liquid Chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 30:1157-1166
- [313] Edmonds CG, Vestal ML, McCloskey JA (1985) Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of nucleosides and of enzymatic hydrolysates of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 13:8197-8205
- [314] Marquet P, Lachâtre G (1999) Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B* 733:93-118
- [315] Sievers D (2000) Reversed-phase Chromatographie unter extremen Bedingungen. *GIT Fachz Lab* 44:236-237
- [316] Tretyakova NY, Chiang S-Y, Walker VE, Swenberg JA (1998) Quantitative analysis of 1,3-butadiene-induced DNA adducts *in vivo* and *in vitro* using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 33:363-376
- [317] Lawley PD, Orr DJ, Jarman M (1975) Isolation and identification of products from alkylation of nucleic acids: Ethyl- and isopropyl-purines. *Biochem J* 145:73-84

- [318] Shuker DEG, Prevost V, Friesen MD, Bartsch H (1993) Noninvasive methods for measuring DNA alkylation in experimental animals and humans. *Environ Health Perspect* 101:151-153
- [319] Tricker AR, Ditrich C, Preussmann R (1991) *N*-Nitroso compounds in cigarette tobacco and their occurrence in mainstream tobacco smoke. *Carcinogenesis* 12:257-261
- [320] Brunnemann KD, Yu L, Hoffmann D (1977) Assessment of carcinogenic volatile *N*-nitrosamines in tobacco and in mainstream and sidestream smoke from cigarettes. *Cancer Res* 37:3218-3222
- [321] Fine DH, Lieb D, Ruffe F (1975) Principle of operation of the thermal energy analyzer for the trace analysis of volatile and non-volatile *N*-nitroso compounds. *J Chromatogr* 107:351-357
- [322] Mitacek EJ, Brunnemann KD, Hoffmann D, Limsila T, Suttajit M, Martin N, Caplan LS (1999) Volatile nitrosamines and tobacco-specific nitrosamines in the smoke of Thai cigarettes: a risk factor for lung cancer and a suspected risk factor for liver cancer in Thailand. *Carcinogenesis* 20:133-137
- [323] Smith CJ, Perfetti TA, Rumple MA, Rodgman A, Doolittle DJ (2000) "IARC group 2A carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Fd Chem Toxicol* 38:371-383
- [324] Smith CJ, Perfetti TA, Mullens MA, Rodgman A, Doolittle DJ (2000) "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Fd Chem Toxicol* 38:825-848
- [325] Scherer G, Adlkofer F (1999) Tabakrauch in der Raumluft - Erfassung der Schadstoffbelastung durch Passivrauchen zur Bewertung des gesundheitlichen Risikos. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 59:435-443
- [326] Benowitz NL (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 18:188-204
- [327] Rebbeck TR (1997) Molecular epidemiology of the human glutathione *S*-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 6:733-743
- [328] Scherer G, Frank S, Riedel K, Meger-Kossien I, Renner T (2000) Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 9:373-380

8 Anhang**8.1 Abkürzungsverzeichnis**

λ	Wellenlänge
3-EtAde	3-Ethyladenin
3-MeAde	3-Methyladenin
ACN	Acrylnitril
bp	Basenpaar(e)
BSG	Bestimmungsgrenze (engl. Limit of Quantitation (LOQ))
CAD	Collision activated dissoziation
CE	Collision energy
CEMA	Cyanoethyl mercapturic acid (Cyanoethylmercaptursäure)
CEP	Collision entrance potential
CXP	Collision cell exit potential
CyEtVal	Cyanoethylvalin
DHS	Deuterierter Hydantoin-Standard
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DP	Declustering potential
EC	Electron capture (Elektroneneinfang)
EI	Electron impact ionization (Elektronenstoßionisation)
EM	Elektromultiplier
EMA	Ethyl mercapturic acid (Ethylmercaptursäure)
EP	Entrance potential
EtOAc	Ethylacetat
EtOEtVal	Etoxyethylvalin
ETS	Environmental Tobacco Smoke (Tabakrauch in der Umgebungsluft)
EtVal	Ethylvalin
eV	Elektronenvolt
FE	Flächeneinheiten
FP	Focusing potential
GC-MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
gef.	gefunden
GST	Glutathion-S-Transferase
Hb	Hämoglobin

HEMA	Hydroxyethyl mercapturic acid (Hydroxyethylmercaptursäure)
(HP)LC	(High Performance) Liquid Chromatography ((Hochleistungs)-Flüssig-Chromatographie)
HPMA	Hydroxypropyl mercapturic acid (Hydroxypropylmercaptursäure)
HS	Hauptstromrauch
HyEtVal	Hydroxyethylvalin
ID	Innendurchmesser
IDS	Interner deuterierter Multikomponentenstandard
iPrMA	Isopropyl mercapturic acid (Isopropylmercaptursäure)
IS	Interner Standard
Konz.	Konzentration
LLE	Liquid-liquid extraction (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
M	Molekülion (positiv oder negativ geladen)
m/z	Masse zu Ladung
MCX	mixed sorbent cation-exchange (Mischphasen-Kationentauschermaterial)
MeVal	Methylvalin
MMA	Methyl mercapturic acid (Methylmercaptursäure)
MRM	Multiple reaction monitoring (Beobachtung des Fragmentierungsmusters in Q2 des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers)
MTBE	Methyl-tert.-butylether
MW	Mittelwert
NAB	<i>N</i> -Nitrosoanabasin
NAT	<i>N</i> -Nitrosoanatabin
NazCA	<i>N</i> -Nitroso-aziridin-carboxylic acid
NC	Nebulizer current
NDEA	<i>N</i> -Nitrosodiethylamin
NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamin
NHMTCA	<i>N</i> -Nitroso-(2-hydroxymethyl)-carboxylic acid
NHPRO	<i>N</i> -Nitroso-4-hydroxy-prolin
NICI	Negativ ion chemical ionization (Negativionen-chemische Ionisation)
NMEA	<i>N</i> -Nitrosomethylethylamin
NMTCA	<i>N</i> -Nitroso-2-methyl-carboxylic acid
NNK	Nicotine-derived nitroso-ke-ton, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon

NNN	<i>N</i> -Nitrosornikotin
NPIP	<i>N</i> -Nitrosopiperidin
NPRO	<i>N</i> -Nitrosoprolin
NPYR	<i>N</i> -Nitrosopyrrolidin
NR	Nichtraucher
NS	Nebenstromrauch
NSAR	<i>N</i> -Nitrososarcosin
NTCA	<i>N</i> -Nitroso-thiazolidine-carboxylic acid
NThz	<i>N</i> -Nitroso-thiazolidin
NVNA	nonvolatile nitrosamines (nicht-flüchtige Nitrosamine)
NWG	Nachweisgrenze (engl. Limit of detection (LOD))
p	statistische Signifikanz
PFPTH	Pentafluorophenyl-thiohydantoin
Port.	Portion
PR	Passivraucher
r	Regressionskoeffizient
R	Raucher
rel.	relativ(e)
res.	Resulting (resultierend(e))
SE	Standard error (Standardfehler)
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Solid phase extraction (Festphasenextraktion)
STABW	Standardabweichung
TSNA	tabacco specific nitrosamines (tabak-spezifische Nitrosamine)
VK	Variationskoeffizient (Standardabweichung in % vom Mittelwert)
VNA	volatile nitrosamines (flüchtige Nitrosamine)
V/V	Volumenanteil
WFR	Wiederfindungsrate
Wo	Woche

8.2 Kontrollkarten

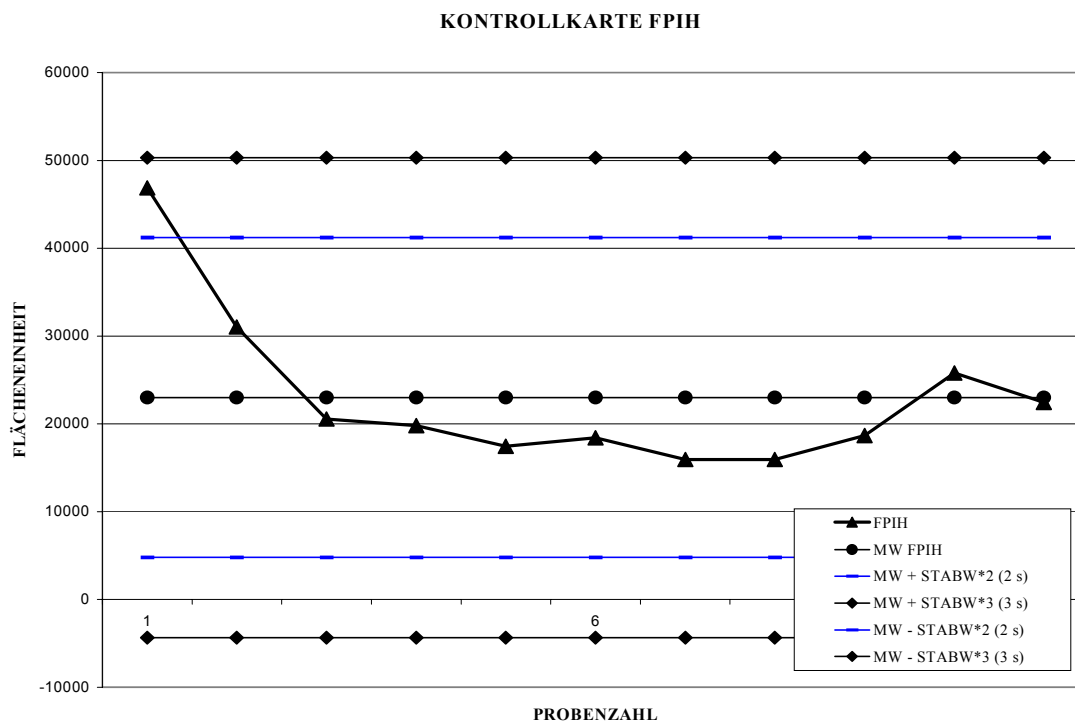


Abb. 8.1: Kontrollkarte FPIH

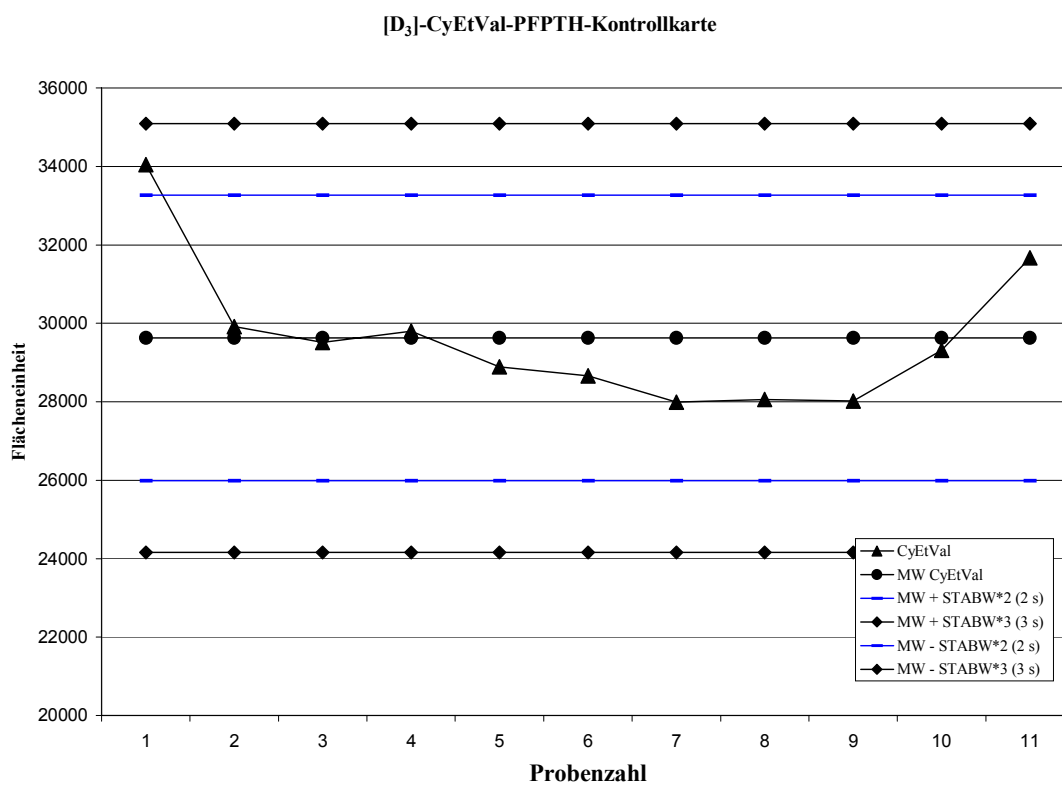


Abb. 8.2: Kontrollkarte CyEtVal

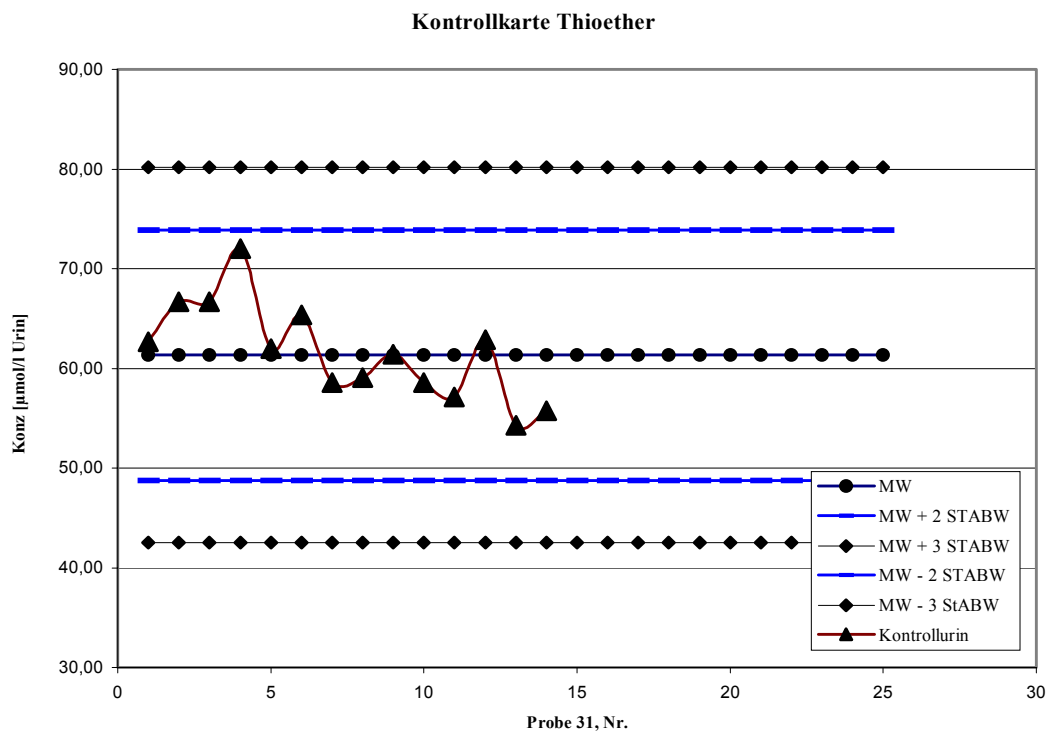


Abb. 8.3: Kontrollkarte Thioether

8.3 Tabellenanhang

Tab. 8.1: Charakteristika, selbst-berichtete und objektiv gemessene Expositionsdaten der Studiengruppen (modifiziert nach [328])

	<i>Mittelwerte ($\pm SE$)</i>			
	Alle Nichtraucher	Nichtraucher	Passivraucher	Raucher
Anzahl	42	23	19	27
Geschlecht [% Frauen]	50	48	53	26 ^{a,b}
Alter [Jahre]	37,6 ($\pm 1,7$)	40,8 ($\pm 2,3$)	33,8 ($\pm 2,3$) ^{a,c}	32,0 ($\pm 1,7$) ^{a,b}
Zigarettenkonsum [Zig./Tag] ^d	0	0	0	17,7 ($\pm 2,1$)
Dauer d. ETS-Exposition [h/Tag] ^d	1,37 ($\pm 0,29$)	0,52 ($\pm 0,10$)	2,43 ($\pm 0,56$) ^{c,e}	--
Intensität d. ETS-Exposition ^{d,f}	1,86 ($\pm 0,36$)	0,67 ($\pm 0,11$)	3,31 ($\pm 0,67$)	--
Nikotin (Personal sampler, [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]) ^d	0,431 ($\pm 0,086$)	0,185 ($\pm 0,041$)	0,730 ($\pm 0,161$) ^{c,e}	--
Thiocyanat im Plasma [$\mu\text{mol}/\text{l}$] ^d	20,9 ($\pm 2,0$)	22,0 ($\pm 2,8$)	19,6 ($\pm 3,1$)	86,7 ($\pm 8,4$) ^{b,g}
Cotinin im Plasma [ng/ml] ^d	0,98 ($\pm 0,12$)	0,71 ($\pm 0,07$)	1,32 ($\pm 0,24$) ^{a,c}	298 (± 39) ^{b,g}
Cotinin im Urin [$\mu\text{g}/24 \text{ h}$] ^d	6,8 ($\pm 2,5$)	2,3 ($\pm 0,5$)	12,3 ($\pm 5,4$) ^{a,c}	2060 (± 300) ^{b,g}

a: $p < 0,05$. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t -Tests für unabhängige Proben ermittelt.

b: Vergleich zwischen Rauchergruppe und der zusammengefassten Nichtrauchergruppe.

c: Vergleich zwischen Passivrauchern und unbelasteten Nichtrauchern.

d: Für alle Probanden ausser einem Raucher, der nach dem 2. Termin das Rauchen aufgab (daher nur Termin 1 und 2 gewertet) wurden die Mittelwerte aus allen 6 Terminen für die Berechnung des Gesamtmittelwertes zugrunde gelegt.

e: $p < 0,01$. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t -Tests für unabhängige Proben ermittelt.

f: Die Intensität der ETS-Exposition wurde berechnet, indem die Dauer der ETS-Exposition mit der berichteten Stärke multipliziert wurde: 1 für leichte Exposition, 2 für mittlere Exposition, 3 für starke Exposition.

g: $p < 0,001$. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t -Tests für unabhängige Proben ermittelt.

Tab. 8.2: Einzelwerte aller Analyten der Probanden der PAH 96-Studie, 6. Termin

a) Hämoglobinaddukte

<i>Proband</i>	<i>MeVal SPE</i> [pmol/g Globin]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>EtVal SPE</i> [pmol/g Globin]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>HyEtVal LLE</i> [pmol/g Globin]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>CyEtVal SPE</i> [pmol/g Globin]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]
1	425,7	17,07	4,01	32,89	2,34	7,10	75,55	6,77	8,96	160,5	6,92	4,31
2	309,5	19,24	6,22	43,50	4,27	9,83	10,67	2,35	22,03	12,17	2,40	19,74
3	492,3	2,26	0,46	42,53	5,60	13,16	348,15	42,85	12,31	236,58	19,69	8,32
4	346,4	10,58	3,05	46,00	10,79	23,46	28,52	13,01	45,64	14,45	1,89	13,09
5	436,6	18,88	4,32	38,02	4,74	12,45	152,42	39,11	25,66	318,93	10,74	3,37
6	455,1	28,33	6,23	44,69			260,36	107,64	41,34	139,97	10,23	7,31
7	556,4	22,17	3,98	38,91	1,73	4,45	242,12	53,52	22,11	342,78	13,17	3,84
8	432,7	20,52	4,74	37,91	7,48	19,73	150,51	27,47	18,25	13,81	0,77	5,59
9	352,2	4,32	1,23	45,48	5,35	11,76	263,43	41,46	15,74	19,31	1,56	8,10
10	319,7	4,22	1,32	30,99	6,54	21,09	23,97	3,36	14,02	13,48	1,92	14,24
11	341,4	0,20	0,06	45,16	5,13	11,36	16,75	3,96	23,61	34,52	0,53	1,53
12	499,3	5,30	1,06	65,19	10,17	15,61	275,2	17,88	6,50	361,91	13,72	3,79
13	502,1			62,22			237,51	34,26	14,42	217,44		
14	402,5	23,24	5,77	11,53			15,02	2,63	17,53	25,39	1,55	6,11
15	334	28,17	8,43	41,72	8,72	20,89	26,31	10,50	39,91	28,2		
16	351,5	24,79	7,05	64,86	5,48	8,45	124,43	4,01	3,22	30,93		
17	391,9	6,94	1,77	24,98			319,38	19,72	6,18	33,83	13,75	0,37
18	263,4	9,95	3,78	46,81	1,05	2,25	17,41	0,23	1,33	30,2	2,91	9,62
19	700,6	7,10	1,01	50,75	3,04	5,98	429,29	83,23	19,39	237,06	10,58	4,46
20	331,3	13,40	4,05	46,86	7,45	15,90	50,03	10,50	20,99	118,49	12,23	10,32
21	311,9	18,87	6,05	53,37	3,76	7,05	3,76	1,87	49,58	34,58	2,40	6,95
22	278,2	23,81	8,56	61,58	4,32	7,01	8,8	2,29	26,02	25,4	3,61	14,22
23	359,1	45,69	12,72	66,83	7,68	11,50	22,66		0,00	40,51		
24	265,9	27,67	10,41	43,16	0,74	1,72	223,98	53,35	23,82	39,06	2,99	7,66
25	432,1	1,68	0,39	60,88	1,75	2,87	19,45	4,63	23,80	233,81	37,82	16,18
26	419,9			61,35			8,82	0,88	9,94	230,57		
27	531,3	35,78	6,73	42	6,43	15,31	97,97	6,46	6,59	221,69	18,93	8,54
28	272,5	13,41	4,92	56,42	6,23	11,04	4,41	0,99	22,38			
29												
30	683	71,52	10,47	53,64			212,68	2,59	1,22	187,15	14,84	7,93
31	295,6	11,71	3,96	30,3	6,41	21,14	10,86	8,98	82,74	29,83	23,69	125,31
32	347	24,12	6,95	40,83	3,23	7,91	77,85	10,58	13,59	119,32	15,46	12,96
33	295,8	9,99	3,38	77,51			50,3	56,00	111,33			
34	341,7	7,04	2,06	39,15			385,71	104,22	27,02			
35	348,1	31,90	9,16	29,94	5,81	19,40	52,77	54,41	103,10	144,66	113,66	78,57
36	322,4			88,18			384,04		0,00	63,61		
37	356,9	26,94	7,55	45,54	2,80	6,15	15,93	2,08	13,04	158,53		
38	419,7	1,79	0,43	98,08	14,39	14,67	14,89	2,00	13,40	79,04	19,05	24,10
39	356,8	1,75	0,49	120,1	11,95	9,95	11,46	8,04	70,16	117,42	23,73	20,21
40	728,7	16,74	2,30	99,55	4,89	4,91	280,5	27,87	9,94	333,33	22,48	6,74
41	328,2	12,81	3,90	74,12	10,10	13,63	20,37	10,82	53,11	92,64	4,51	4,86
42	395,6	6,16	1,56	36,48	3,50	9,60	20,65	8,94	43,29	24,54	3,65	14,89
43	374,6	5,88	1,57	30,66	3,66	11,93	37,86	1,53	4,03	117,68		
44	404,1	16,72	4,14	55,81	7,39	13,24	20,71	18,68	90,18	127,06	3,71	2,92
45	408,4	2,61	0,64	38,26	6,44	16,82	5,18	2,37	45,76	70,68		
46	393,6	0,66	0,17	38,58	0,86	2,23	59,16	81,36	137,54	22,77	5,11	22,43
47	343,8	13,20	3,84	18,45	4,57	24,79	80,69	10,12	12,55	22,63	2,28	10,07
48	456,7	13,50	2,96	26,01	1,06	4,06	107,62	135,75	126,14	115,71	4,16	3,59
49	397,5	52,13	13,11	26,52			35,5	41,90	118,03	17,3	0,94	5,41
50	357,7	6,52	1,82	22,27	3,13	14,06	8,95	1,18	13,23	26,57		
51	333,6	12,82	3,84	21,06	1,53	7,25	42,69	1,19	2,78	17,33	4,18	24,13
52	182,9	15,06	8,23				3,88	1,41	36,33	11,38		
53	423						65,73	5,95	9,06			
54	439,8	34,07	7,75	21,14	1,25	5,91	156,73	9,90	6,32	338,86	60,06	17,72
55	368,2	26,31	7,14	102,1	13,17	12,90						
56	287,1	15,68	5,46	19,22			10,9	5,96	54,67	27,76		
57	576,2	1,42	0,25	33,36	3,89	11,66	350,76	218,91	62,41	81,94	0,78	0,95
58	986	32,19	3,26	25,96			268,56	280,42	104,41	246,67	61,59	24,97

Fortsetzung Tab. 8.2: a) Hämoglobinaddukte

<i>Proband</i>	<i>MeVal SPE</i> [pmol/g Globin]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>EtVal SPE</i> [pmol/g Globin]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>HyEtVal LLE</i> [pmol/g Globin]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>CyEtVal SPE</i> [pmol/g Globin]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]
59	275,7	21,21	7,69	30,39	0,96	3,16	30,54	27,15	88,93	29,32	1,78	6,08
60	382,8	12,57	3,28	24,39	1,79	7,32	53,59	39,84	74,34			
61	360,8	5,23	1,45	30,14			140,75	4,36	3,10			
62	375,6	0,79	0,21	23,94	2,78	11,63	116,22	126,32	108,68	99,41	5,05	5,08
63	359,4	7,17	2,00	29,95	1,40	4,67	28,64	16,16	56,42	28,67	2,41	8,40
64	472,9	3,96	0,84	35,43	2,31	6,52	103,6	17,35	16,75	237,6	11,36	4,78
65	407,8	8,75	2,15	24,73			119,05	14,70	12,35			
66	320,9	1,41	0,44	32,49	1,73	5,33	14,62	9,18	62,80			
67	587,9	11,41	1,94	25,46	2,57	10,11	627,23	53,26	8,49	371,65	15,93	4,29
68	468,1	15,16	3,24	17,59	2,16	12,29	27,11	17,02	62,77	44,44	5,65	12,72
69	420,9	7,11	1,69	22,24	1,11	5,01	44,4		0,00	111,42	1,80	1,62
70	440,2	13,58	3,08	20,71	3,07	14,83	16,73		0,00	25,37	1,57	6,19

b) Mercaptursäuren

<i>Proband</i>	<i>MMA</i> [µg/24 h]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>EMA</i> [µg/24 h]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>HPMA</i> [µg/24 h]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>CEMA</i> [µg/24 h]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>HEMA</i> [µg/24 h]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]
1	90,26	1,17	2,84	5,01	0,31	13,45	980,38	31,95	7,17	2002	19,46	2,14	144,49	3,80	5,79
2	61,49	5,45	7,98	19,98	2,21	9,98	253,44	19,75	7,02	881,68	61,36	6,26	929,74	50,67	4,91
3	88,56	1,65	4,47	26,67	1,29	11,57	1706,21	40,34	5,67	2024,2	13,83	1,64	399,73	9,83	5,90
4	124,41	2,35	7,36	18,27	2,19	46,76	1789,42	150,77	32,9	2822,4	28,94	4,00	2194,17	21,17	3,76
5	54,13	1,04	2,99	6,98	1,49	33,19	2336,52	141,29	9,37	1563,6	14,07	1,39	1033,23	21,38	3,21
6	47,12	2,72	12,70	2,6	0,21	18,08	747,35	16,25	4,78	2058,5	21,05	2,25	1067,68	19,66	4,05
7	54,04	3,88	10,78	26,18	1,87	10,74	896,25	57,66	9,65	1451,1	11,83	1,22	1248,99	16,58	1,99
8	71,06	3,00	6,33	14,21	0,83	8,75	742,59	37,34	7,54	1305,6	18,85	2,17	1374,97	80,72	8,81
9	150,63	2,20	4,96	5,52	0,77	47,32	1190,64	27,07	7,73	3411,9	21,34	2,13	1712,27	24,73	4,91
10	62,62	0,69	2,19	10,08	1,34	26,60	252,3	5,14	4,07	1337,5	66,16	9,89	202,87	7,86	7,75
11	175,44	3,69	6,74	29,14	2,44	26,80	327,59	8,04	7,85	1855,2	56,56	9,76	2087,37	6,44	0,99
12	194,57	1,62	2,37	25,5	0,70	7,82	4919,37	99,59	5,77	1869,7	76,38	11,6	626,89	23,48	10,7
13															
14	25,54	2,75	16,70	2,71	0,97	55,46	106,71	3,40	4,95	1080	22,16	3,18	530,69	7,97	2,33
15	34,07	1,72	6,80	3,4	0,69	27,43	385,51	23,96	8,39	933,49	22,40	3,24	218,78	17,76	11,0
16	55,96	1,85	7,43	5,94	0,35	13,21	238,72	10,21	9,62	1301	71,12	12,3	296,24	14,82	11,3
17	52,22	1,63	2,81	16,6	2,15	11,65	485,97	32,81	6,08	619,01	93,86	13,6	497,61	35,33	6,39
18	51,95	1,83	6,33	7,07	0,99	25,19	583,32	30,11	9,29	1214,8	50,02	7,41	475,02	36,74	13,9
19	101,71	0,82	1,49	17	2,32	25,21	5804,13	188,81	6,02	1815,1	24,09	2,46	515,36	25,29	9,08
20	55,7	2,97	8,53	4,9	0,76	24,88	2051,64	41,66	3,25	2727,9	27,27	1,60	303,34	13,21	6,97
21	83,03	3,44	8,28	17,54	0,96	10,97	660,21	37,50	11,36	1401,8	62,79	8,96	1833,96	86,19	9,40
22	120,7	0,89	1,70	23,24	1,50	14,83	2955,33	60,89	4,74	1273,9	73,70	13,3	5882,81	176,37	6,90
23	25,44	2,32	9,12	4,91	1,08	22,04	1019,19	60,55	5,94	605,36	44,29	7,32	322,04	110,03	34,2
24	53,33	2,61	8,32	23,3	1,14	8,30	295,19	13,44	7,74	1042,5	33,58	5,48	395,2	82,56	35,5
25	38,79	0,69	2,59	8,84	4,09	67,00	785,42	602,14	111,16	1439,1	129,73	13,1	174,08	77,81	64,8
26	83,08	6,38	8,83	36,1	3,25	10,35	2597,73	227,73	10,08	1723,1	113,84	7,60	66,57	2,70	4,66
27	25,33	1,83	10,13	1,33	0,42	43,80	1677,63	34,73	2,90	1300,5	18,43	1,98	1661,3	60,62	5,11
28	40,72	1,45	4,27	9,79	1,32	16,23	121,16	6,77	6,71	658,43	28,44	5,18	337,33	6,07	2,16
29															
30	32,66	1,30	4,79	9,6	1,36	17,06	2088,4	136,02	7,82	895,24	92,28	12,4	83,44	4,48	6,45
31	72,18	2,74	8,74	17,98	1,62	20,76	450,23	13,89	7,10	1677,2	9,44	1,29	310,89	6,29	4,66
32	83,35	2,46	9,90	7,33	0,56	25,58	183,26	5,54	10,12	3877,5	102,31	8,84	513,78	6,62	4,32
33	48,86	1,66	6,28	2,1	0,48	42,38	367,04	1,09	0,55	2420,6	132,07	10,1	270,37	3,60	2,46
34	33,24	3,26	15,22	3,58	0,29	12,41	177,2	10,52	9,20	678,1	54,57	12,5	225,18	18,71	12,9
35	49,57	2,89	12,25	5,45	1,80	69,35	171,31	4,51	5,53	1172,8	64,76	11,6	1462,53	57,38	8,24
36	43,5	3,67	12,65	18,27	0,75	6,15	732,92	30,39	6,22	1435,9	118,70	12,4	270,85	27,82	15,4
37	142,54	5,61	9,84	12,05	2,63	54,65	2210,54	286,73	32,4	1419,3	41,49	7,31	514,73	8,57	4,16
38	11,6	1,82	9,40	2,56	0,26	6,04	229,73	13,96	3,65	875,48	208,76	14,3	203,2	4,31	1,27
39	45,48	2,03	6,90	6,74	0,92	21,25	281,88	23,18	12,75	568,64	31,06	8,47	79,96	4,93	9,56
40	91,67	3,69	12,88	11,72	0,17	4,72	2688,63	116,35	13,85	1424,5	48,73	10,9	762,42	13,73	5,76
41	66,08	0,18	0,47	7,52	1,48	33,38	768,58	57,01	12,61	1097,2	58,07	9,00	271,11	25,03	15,7
42	57,39	1,93	4,71	15,13	3,90	36,10	399,98	18,01	6,30	2061,2	26,44	1,80	558,47	1,59	0,40
43	51,71	3,38	6,22	9,64	1,62	15,95	200,07	34,91	16,58	2319,2	94,67	3,88	152,28	5,20	3,25

Fortsetzung Tab. 8.2: b) Mercaptursäuren

Proband	MMA [µg/24 h]	STABW	VK [%]	EMA [µg/24 h]	STABW	VK [%]	HPMA [µg/24 h]	STABW	VK [%]	CEMA [µg/24 h]	STABW	VK [%]	HEMA [µg/24 h]	STABW	VK [%]
44	68,35	1,43	2,35	20,51	1,41	7,68	1759,56	11,14	0,71	1281,4	41,91	3,66	268,82	33,22	13,8
45	38,97	6,01	29,30	5,12	0,78	28,78	148,57	4,59	5,87	689,25	34,44	9,50	196,56	12,71	12,3
46	36,21	2,90	9,22	6,33	1,54	28,04	272,8	48,61	20,5	2126,1	232,66	12,6	277,79	14,40	5,96
47	137,85	3,29	6,44	10,01	3,39	91,44	724,12	6,79	2,53	1967,4	59,06	8,10	709,63	22,10	8,41
48	26,77	2,12	7,11	5,58	4,49	72,43	1037,28	119,93	10,41	1277,5	38,04	2,68	236,02	37,44	14,3
49	54,86	0,54	1,98	12,4	2,07	33,36	1142,1	19,15	3,35	1417,3	54,98	7,76	110,69	2,81	5,08
50	45,06	2,52	7,82	8,17	1,41	24,09	1849,86	51,58	3,90	1144,4	98,33	12,0	523,97	40,46	10,8
51	94,88	3,77	8,15	26,4	0,51	3,93	455,59	15,09	6,79	3096,4	119,39	7,90	394,51	22,41	11,6
52	44,76	2,48	10,53	15,32	4,07	50,48	696,33	44,91	12,26	3213,8	201,54	11,91	464,37	17,73	7,25
53	46,25	3,62	8,61	15,83	1,59	11,04	782,93	47,30	6,65	1121,1	44,02	4,32	167,26	20,35	13,4
54	115,86	0,74	1,82	10,26	1,40	38,91	1720,78	54,91	9,09	3422,6	47,76	3,98	341,16	15,63	13,1
55															
56	74,64	3,05	7,57	13,96	4,44	58,82	678,67	54,97	14,98	1823,9	29,76	3,02	404,39	26,92	12,3
57	106,58	1,40	3,88	19,58	0,40	6,03	1063,11	158,12	43,9	1775,5	41,68	6,93	343,14	14,80	12,7
58	100,62	2,30	5,49	21,95	1,10	12,04	1048,51	54,16	12,40	2621,4	8,20	0,75	416,38	12,54	7,23
59	47,21	1,78	4,34	27,38	2,75	11,57	218,28	6,82	3,59	1251,7	13,81	1,27	394,06	13,85	4,04
60	49,02	3,59	12,09	20,3	1,57	12,72	310,71	11,42	6,06	1745,2	127,02	12,0	400,51	20,96	8,64
61	25,64	3,33	13,63	3,87	0,31	8,52	134,64	10,68	8,33	1266,9	22,93	1,90	263,23	26,54	10,6
62	85,93	3,55	5,37	19,84	2,94	19,29	1514,95	120,67	10,35	2248,5	39,84	2,30	771,36	71,34	12,0
63	24,69	1,09	5,32	2,87	1,22	50,99	1119,9	30,93	3,31	2744,9	286,31	12,5	860,36	20,76	2,90
64	69,82	2,62	8,83	5,79	1,85	75,31	3035,03	78,76	6,10	2566,4	8,97	0,82	570,36	13,49	5,56
65	77,46	4,35	11,79	6,04	0,95	32,99	211,42	6,99	6,94	903,91	50,83	11,81	338,61	15,53	9,63
66	78,19	7,93	13,69	50,41	2,59	6,94	529,89	16,05	4,09	1771,3	75,04	5,72	339,12	28,33	11,3
67	141,26	1,81	3,07	48	2,23	11,16	1623,04	45,29	6,70	3235	15,12	1,12	562,94	17,86	7,61
68	58,24	3,47	5,96	13,63	0,59	4,34	798,83	26,98	3,38	1575,7	11,44	0,73	917,45	18,15	1,98
69	33,28	6,52	10,58	16,44	2,81	9,23	521,89	58,02	6,00	927,83	71,16	4,14	122,57	20,21	8,90
70	39,96	3,29	5,77	8,58	0,23	1,91	368,33	20,85	3,96	430,33	54,82	8,92	346,49	18,71	3,78

c) Thioether und DNA-Addukte

Proband	Thioether [µmol/24 h]	STABW	VK [%]	Thioether/Kreatinin µmol/g Kreatinin	3-MeAde [µg/24 h]	STABW	VK [%]	3-EtAde [ng/24 h]	STABW	VK [%]
1	92,7	0,74	1,65	118,69	17,7	4,38	4,36	171,7	0,044	4,506
2	90,6	1,89	1,87	61,45	6,9	1,77	1,83	57,3	0,007	0,820
3	216,8	3,30	3,65	131,11	17,4	6,14	6,77	168,1	0,198	22,605
4	163,8	0,94	2,24	80,15	8,7	2,83	10,17	158,2	0,037	7,299
5	172,57	1,89	1,55	88,03	3,5	2,19	7,75	62,5	0,062	12,305
6	108,53	1,89	3,82	124,17	8,3	6,60	13,92	17,1	0,055	56,316
7	130	2,83	2,79	148,07	10,6	1,12	1,26	161,1	0,029	2,188
8	74,5	3,30	9,08	122,33	0,7	0,32	5,36	7,8	0,006	9,080
9	175,67	1,41	5,66	175,32	2,1	0,16	2,15	66,8	0,017	6,805
10	63,33	3,30	10,42	53,4	0,7	0,39	8,95	21,6	0,003	2,437
11	137,6	1,89	7,86	113,76	21,3	12,15	14,62	130,6	0,017	3,269
12	246,05	0,47	0,29	133,85	20,6	1,06	1,17	127,1	0,012	2,171
13	85,28	3,77	2,22	76,82	9,9	11,74	8,05	100,5	0,028	1,889
14	66,23	25,42	104,17	184,57	2,7	1,94	8,77	63,2	0,016	3,180
15	142,23	0,00	0,00	121,03	1,1	0,49	4,82	19,0	0,020	11,353
16	159,11	1,01	2,89	151,42	3,9	1,32	6,07	35,9	0,001	0,389
17	180	0,51	0,43	122,06	3,9	5,04	9,29	71,9	0,124	12,397
18	117,64	2,53	4,94	111,91	1,0	9,65	144,37	25,8	0,024	13,572
19	167,82	4,04	4,45	108,38	21,7	12,11	12,74	251,7	0,070	6,318
20	145,14	0,00	0,00	68,62	10,8	7,85	9,34	89,5	0,039	5,509
21	70,71	1,52	4,29	64,94	6,5	2,60	6,41	25,5	0,015	9,348
22	161,82	3,54	5,03	91,97	6,2	0,14	0,42	66,4	0,022	6,151
23	190	0,00	0,00	129,69	1,2	1,95	12,81	1,3	0,004	22,617
24	184,88	4,71	4,64	92,47	4,7	3,28	9,44	15,1	0,014	12,708
25	108,75	2,36	3,14	77,92	1,2	0,25	2,37	10,8	0,008	8,932
26	185,92	8,25	5,10	95,15	7,0	0,86	1,13	140,9	0,126	8,258
27	155,75	5,30	4,77	116,31	2,7	1,29	5,40	89,6	0,045	5,654
28	39,14	3,70	11,35	53,26	4,7	0,44	0,91	34,0	0,009	2,431

Fortsetzung Tab. 8.2: c) Thioether und DNA-Addukte

<i>Proband</i>	<i>Thioether</i> [μmol/24 h]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>Thioether/Kreatinin</i> μmol/g Kreatinin	<i>3-MeAde</i> [μg/24 h]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]	<i>3-EtAde</i> [ng/24 h]	<i>STABW</i>	<i>VK</i> [%]
29										
30	25,14	6,40	4,66	18,6	20,8	13,66	6,32	148,5	0,014	0,916
31	228,36	4,04	11,79	150,32	5,4	3,77	12,93	2,0	0,001	2,499
32	153,14	1,01	4,29	147,7	0,4	0,10	6,83	21,4	0,026	32,086
33	45,81	0,34	1,19	55,83	0,8	0,48	8,94	14,3	0,002	2,295
34	39,49	2,69	7,44	40,83	13,9	8,75	7,81	1,3	0,004	7,482
35	57,5	0,67	1,33	61,05	4,0	2,15	9,09	85,0	0,030	5,995
36	137,86	2,02	1,85	55,5	1,7	2,10	14,98	75,3	0,056	8,959
37	136,9	1,35	2,46	64,01	1,4	1,32	18,67	8,9	0,000	0,980
38	31,43	2,69	5,14	45,65	3,7	6,51	8,52	1,5	0,003	10,566
39	28,79	1,01	7,44	100,66	3,0	0,17	0,72	1,3	0,025	19,390
40	106,67	0,67	1,01	105,49	13,3	10,26	19,81	125,6	0,035	7,039
41	91,88	1,01	1,29	52,6	7,8	1,40	2,44	43,5	0,006	1,798
42	132	2,69	2,86	68,03	0,0	0,34	130,21	31,1	0,005	1,723
43	47,95	4,04	8,00	63,47	3,3	0,73	1,67	6,4	0,001	1,626
44	107,2	0,67	0,64	73,44	10,3	5,80	5,04	68,9	0,010	1,250
45	42,07	3,37	6,20	36,69	5,6	1,08	2,97	71,6	0,037	7,828
46	60,24	2,69	5,14	53,58	4,7	2,24	4,43	4,7	0,001	2,606
47	137,57	3,37	6,61	71,21	1,4	1,37	21,74	2,3	0,018	4,900
48	79,29	1,35	1,32	56,02	1,5	1,46	7,24	42,2	0,047	8,072
49	221,9	0,34	0,44	100,77	4,5	2,31	8,17	12,6	0,013	16,239
50	185	3,03	2,68	95,65	3,7	1,00	3,05	5,1	0,003	6,747
51	119,58	1,01	2,07	98,37	1,7	0,90	8,48	166,4	0,052	5,093
52	82,33	0,67	1,55	45,59	1,1	1,89	25,62	3,9	0,001	4,365
53	95,86	8,75	10,05	79,29	6,1	1,36	1,96	16,7	0,016	8,286
54	147,25	7,07	13,69	104,17	7,4	2,47	7,65	67,3	0,010	3,296
55										
56	88,1	0,67	1,41	57,76	0,2			1,6	0,030	10,346
57	80,77	4,04	11,31	57,16	15,4	4,30	6,59	127,8	0,070	12,983
58	127,64	5,39	8,26	92,89	4,7	2,18	8,93	100,2	0,057	10,997
59	118,66	5,39	4,98	57,85	3,0	2,99	9,09	158,2	0,082	4,742
60	89,25	6,06	10,70	52,01	3,6	0,41	1,49	26,8	0,024	11,637
61	56,8	0,67	1,19	49,15	6,8	2,04	2,51	6,3	0,005	7,281
62	102,52	3,03	3,67	56,29	9,9	9,47	9,90	88,5	0,037	4,350
63	73,64	2,69	4,19	49,45	6,1	3,35	5,30	10,4	0,012	11,486
64	175,72	0,34	0,43	78,63	17,2	4,32	4,72	132,1	0,005	0,678
65	24,34	1,01	8,32	28,69	4,0	1,17	4,95	22,0	0,007	5,187
66	50,63	5,72	14,57	54,62	10,6	5,22	5,31	78,0	0,087	11,984
67	107,45	0,34	0,46	57,59	31,8	12,30	7,43	870,4	0,152	3,350
68	102,95	1,01	0,94	111,91	2,7	0,04	0,11	9,5	0,002	1,612
69	60,63			55,8	1,2		26,88	120,2		
70	80,5	7,41	6,15	43,51	5,6	8,89	8,88	69,2	0,046	3,698

Tab. 8.3: Isotopenhäufigkeit von MeVal-d0-PFPTH (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
338	16,8	15,9	4,7	5,55
323	9,8	12,7	-	5,34
310	14,1	14,8	6,3	5,21
296	11,5	12,6	4,8	5,15
277	12,2	-	5,4	-
225	72,4	9,2	11,3	4,86
167	25	6,6	6,4	0,18

Tab. 8.4: Isotopenhäufigkeit von MeVal-d3-PFPTH (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
341	15,9	15,9	5,7	5,55
326	15,8	12,6	5,7	5,34
313	14,1	14,7	5,2	5,21
299	12,8	12,6	5,6	5,15
280	12,6	-	5,4	-
225	36,2	9,2	28,8	4,86
167	43	6,6	11,5	0,18

Tab. 8.5: Isotopenhäufigkeit von EtVal-d0-PFPTH (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
352	17,0	17,1	5,4	5,71
337	14,8	15,9	4,9	5,6
324	13,1	15,9	6,2	5,35
310	14,4	13,7	5,4	5,28
309	1003,6	13,72	44,8	5,33
291	14,1	-	6,7	-
282	14,6	11,4	5,3	5,05
225	43,0	9,2	11,2	4,86
167	64,5	6,6	0,05	0,18

Tab. 8.6: Isotopenhäufigkeit von EtVal-d5-PFPTH (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
357	17,1	17,1	5,6	5,71
342	14,5	15,9	5,1	5,6
329	13,5	15,8	6,4	5,35
315	14,1	13,6	5,6	5,28
310	19,5	13,7	4,7	5,33
296	16,1	-	5,6	-
283	14,2	11,4	6,0	5,05
225	23,9	9,2	43,1	4,86
167	36,8	6,6	21,2	0,18

Tab. 8.7: Isotopenhäufigkeit von CyEtVal-d0-PFPTH (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
377	16,9	18,5	5,6	5,94
362	6,3	17,4	3,4	5,71
349	46,2	17,4	34,9	5,51
335	14,7	15,15	6,3	5,41
316	19,62	-	8,9	-
309	20,23	13,67	10,6	5,28
282	11,4	11,47	5,2	5,05
225	44,9	9,2	12,6	4,66
167	-	6,6	17,5	0,18

Tab. 8.8: Isotopenhäufigkeit von CyEtVal-d3-PFPTH (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
380	18,7	18,5	6,3	5,94
365	16,4	17,4	5,7	5,71
352	31,0	17,4	10,4	5,51
338	17,1	15,1	6,1	5,41
319	17,56	-	5,7	-
310	43,5	13,7	83,6	5,28
283	29,9	11,5	6,8	5,05
225	32,3	9,2	31,4	4,66
167	50,7	6,6	16,37	0,18

Tab. 8.9: Isotopenhäufigkeit von HyEtVal-PFPTH (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
350	-	17,1	-	5,7
308	9,6	13,7	7,7	3,27
251	-	-	-	-
235	-	-	20,3	-
225	-	9,2	-	4,66
183	-	-	-	-
182	138,1	-	-	-

Tab. 8.10: Isotopenhäufigkeit von EtOEtVal-PFPTH (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
396	20,8	19,8	5,1	6,3
381	-	18,3	5,6	6,1
363	16,5	-	1,6	-
350	21,3	-	13,6	-
325	12,4	14,8	5,2	5,4
308	17,6	-	21,7	-
282	12,9	10,4	5,8	4,9
263	14,4	-	-	-
225	68,6	9,2	10,4	4,66
194	17,0	-	4,5	-
167	52,6	6,6	10,1	0,18
117	5,7	-	1,4	-

Tab. 8.11: Isotopenhäufigkeit von MeVal-d0-PFPTH (NICI/EC)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
338	14,9	16,0	1,1	4,6
318	26,0	16,0	4,7	4,6
298	32,1	16,0	22,4	4,6
189	8,1	9,2	0,26	0,34

Tab. 8.12: Isotopenhäufigkeit von MeVal-d3-PFPTH (NICI/EC)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
341	18,9	16,0	5,5	5,2
313	17,7	14,9	7,9	5,2
293	18,3	14,8	10,7	5,2
238	10,4	10,3	4,7	4,7
225	10,7	8,9	11,1	4,7

Tab. 8.13: Isotopenhäufigkeit von EtVal-d0-PFPTH (NICI/EC)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
351	16,14	17,14	1,04	4,6
331	27,2	17,1	2,9	4,6
306	12,86	15,22	0,81	0,98
207	7,7	-	0,2	-
189	6,3	9,2	-	0,34

Tab. 8.14: Isotopenhäufigkeit von EtVal-d5-PFPTH (NICI/EC)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
357	15,18	17,05	1,06	4,6
336	16,1	17,03	6,42	4,6
318	16,19	15,9	7,21	4,6
298	25,6	15,9	-	4,6
189	10,01	9,2	2,5	0,34

Tab. 8.15: Isotopenhäufigkeit von CyEtVal-d0-PFPTH (NICI/EC)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
377	-	-	3,9	5,9
357	18,9	18,6	16,8	5,9
349	7,4	16,4	5,9	5,5
329	17,9	16,3	8,3	5,5
304	14,1	14,9	2,5	5,4
274	12,6	12,9	13,3	4,9

Tab. 8.16: Isotopenhäufigkeit von CyEtVal-d3-PFPTH (NICI/EC)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
360	18,9	18,6	9,9	5,9
352	19,9	17,4	12,8	5,5
349	-	-	8,4	5,5
332	22,8	17,4	7,8	5,5
329	14,2	16,3	37,2	5,5
304	12,3	16,9	6,2	5,4
277	15,9	12,9	5,2	4,9

Tab. 8.17: Isotopenhäufigkeit von HyEtVal-PFPTH (NICI/EC)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
368	16,1	17,2	5,8	5,7
348	18,2	17,2	13,4	5,7
317	13,6	16,0	5,3	5,54

Tab. 8.18: Isotopenhäufigkeit von EtOEtVal-PFPTH (NICI/EC)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
395	17,4	19,9	9,1	6,3
377	16,8	19,9	8,9	6,3
246	10,4	12,6	4,8	0,9

Tab. 8.19: Isotopenhäufigkeit von MMA-Methylester (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
191	5,6	9,2	5,5	5,25
144	6,5	8,0	1,4	5,0
132	6,5	6,5	5,6	4,9
100	5,26	5,29	18,8	4,7
90	9,1	5,8	4,4	4,7
88	6,7	5,3	62,3	4,5

Tab. 8.20: Isotopenhäufigkeit von EMA-Methylester (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
205	10,3	10,3	6,0	5,3
146	8,1	7,6	5,3	5,0
114	16,0	6,4	6,9	4,7
104	5,7	7,0	4,5	4,6
102	30	6,4	413	4,5
88	6,2	5,3	1,0	4,4

Tab. 8.21: Isotopenhäufigkeit von iPrMA-Methylester (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
219	7,2	11,4	6,5	5,4
160	8,9	8,8	10,8	5,1
145	8,0	7,3	1,3	0,8
127	9,1	7,3	1,3	0,6
118	9,4	6,8	4,9	4,5
117	-	-	-	-
102	17,7	6,4	4,8	4,5
86	-	-	-	-

Tab. 8.22: Isotopenhäufigkeit von CEMA-Methylester (EI)

<i>Fragment</i>	<i>[A+1]⁺ [%]</i>		<i>[A+2]⁺ [%]</i>	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
230	13,7	11,8	5,0	5,4
198	16,0	10,6	6,5	5,1
171	8,7	9,1	4,9	5,1
139	31,7	7,9	6,9	4,8
129	12,0	7,2	10,6	4,5
117	6,6	5,0	5,5	0,7

Lebenslauf:

Persönliche Daten

Name: Michael Urban
Geburtsdatum: 31.07.1971
Geburtsort: Augsburg
Eltern: Astrid Urban, geb. Bartsch
Günter Urban
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977 – 1981 Volksschule am Pappelweg, Augsburg
1981 – 1990 Gymnasium bei St. Stephan, Augsburg
Abschluss: Abitur

Wehrdienst

1990 – 1991 PzGrenBtl 222, Murnau

Studium

1991 – 1998 Diplomstudiengang Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1994 Vordiplom
1998 Hauptdiplom
1999 Diplomarbeit im Analytisch-biologischen Forschungslabor, München; Thema: Darstellung, Charakterisierung und Analytik von 2-Hydroxymethyl-*N*-nitroso-thiazolidin-4-carbonsäure und anderen *N*-Nitrosaminosäuren

Promotion

Seit August 1999 Durchführung der Promotionsarbeit im Analytisch-biologischen Forschungslabor, München unter Anleitung von PD Dr. G. Scherer (ABF) und Prof. Dr. Franz Bracher (Department für Pharmazie-Zentrum für Pharmaforschung, LMU München)